ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG DER LECITHIN-CHOLESTERIN-ACYLTRANSFERASE

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

Vorgelegt dem Fachbereich Chemie
der
Philipps-Universität Marburg/Lahn

von

HANS-JÜRGEN MENZEL
aus Erpen

Marburg/Lahn (1978)

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG DER LECITHIN-CHOLESTERIN-ACYLTRANSFERASE

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

Vorgelegt dem Fachbereich Chemie
der
Philipps-Universität Marburg/Lahn

von

HANS-JÜRGEN MENZEL

aus Erpen

Marburg/Lahn (1978)

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Von dem Fachbereich Chemie der Philipps-Universität Marburg/Lahn als

Dissertation angenommen am 22.6.1978
Tag der mündlichen Prütung am 5.7.1978
Berichterstatter: Prof. Dr. P. Karlson
Mitberichterstatter: Prof. Dr. H. Kindl

Inhaltsverzeichnis

		Seite
Allgemeiner Teil		
1.	Einleitung	
1.1.	Das Enzym Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase	1
1.2.	Physiologische Bedeutung des Enzyms	4
1.3.	Bisherige Versuche zur Reinigung der LCAT	6
2.	Aktivitätsbestimmung der Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase	
2.1.	Testmethoden	8
2.2.	Versuche zur Linearitätsbestimmung der LCAT-Reaktion	9
2.3.	Aktivitätsbestimmungen bei normalen Personen und Patienten mit primärer und sekundärer LCAT-Defizienz	11
3.	Isolierung des Enzyms aus menschlichem Plasma	16
4.	Eigenschaften der Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase	
4.1.	Reinheitsbestimmungen	21
4.2.	Molekulargewichtsbestimmungen	24
4.3.	Weitere Eigenschaften des Enzyms	28
5.	Charakterisierung eines Antiserums gegen LCAT	31
6.	In vitro Substitutionsversuche	36
7.	Diskussion	44
8.	Zusammenfassung	49
Experimenteller Teil		
1.	Aktivitätsbestimmung der LCAT	51
2.	Isolierungsmethode für die LCAT	54

		Seite
3.	Polyacrylamidgelelektrophoresen	
3.1.	Diskontinuierliches System nach Ornstein und Davis mit Natrium-taurocholat	57
3.2.	Isoelektrische Flachgelfokussierung	60
3.3.	Gelelektrophorese in SDS nach Weber und Osborn	62
3.4.	Diskontinuierliches SDS-Gelelektro-phoresesystem nach Neville	64
3.5.	Färben und Entfärben	66
4.	Immunologische Methoden	
4.1.	Herstellung der Antisera	68
4.2.	Absorption und Inhibition	68
4.3.	Immundiffusion nach Ouchterlony	69
4.4.	Quantitative Elektroimmunodiffusion	71
4.5.	Herstellung der Anti-Apo-D-Sepharose	72
5.	Verschiedenes	
5.1.	Proteinbestimmung nach Lowry	74
5.2.	Cholesterin und Cholesterinester-bestimmung	75
5.3.	Gelchromatographie	75
5.4.	Herstellung des Hydroxylapatits	76
5.5.	Dichtegradientenultrazentrifugation	77
5.6.	Aminosäureanalyse	78
5.7.	Elektronenmikroskopie	79
6.	Chemikalien	80
7.	Abbkürzungen	80
	Literaturverzeichnis	81

A l l g e m e i n e r T e i l

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546009_0054

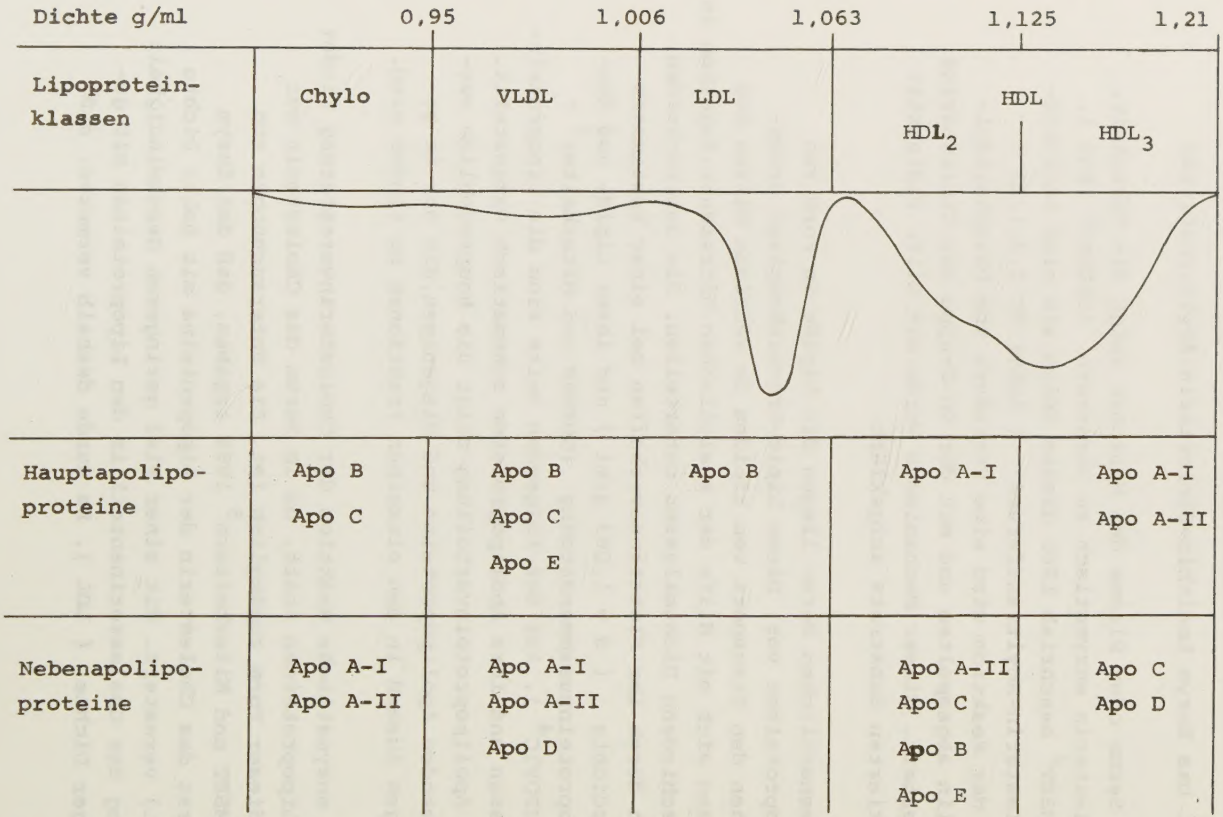
1. Einleitung

1.1. Das Enzym Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase

Das Serum oder Plasma des Menschen zeigt die Fähigkeit, Cholesterin enzymatisch zu verestern (SPERRY[1] 1935). GLOMSET[2] beschrieb 1962 dieses Enzym als eine Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase (LCAT; EC 2.3.1.43). Bei der Reaktion wird eine Fettsäure vom Phosphatidylcholin abgespalten und mit der OH-Gruppe des Cholesterins verestert. Dieser Mechanismus wurde mit Hilfe radioaktiv markierten Substrats aufgeklärt.

Im menschlichen Serum liegen die Lipide in Form von Lipoproteinen vor. Diese Lipid-Proteinkomplexe ermöglichen den Transport von Lipiden im wäßrigen Milieu und lassen sich mit Hilfe der analytischen Ultrazentrifugation in verschiedene Dichteklassen unterteilen. Sie unterscheiden sich durch ihr Flotationsverhalten bei einer bestimmten Salzdichte (d = 1,063 g/ml) und ihrer Lipid- und Apolipoproteinzusammensetzung (GOFMAN und Mitarbeiter[3] ; ALAUPOVIC[4]). Auf der folgenden Seite sind die Lipoproteinklassen und ihre Apolipoproteine schematisch dargestellt. Die Apolipoproteinverteilung zeigt die hauptsächlich vorkommenden Apolipoproteine und diejenigen,die nur in geringem Ausmaß in den einzelnen Fraktionen zu finden sind.

Die enzymatische Reaktion der Cholesterinveresterung findet an Lipoproteinen statt, da im Serum das Cholesterin nur in dieser Form zugänglich ist. Die Untersuchungen von GLOMSET und Mitarbeitern[5] 1966 ergaben, daß das Enzym zuerst das Cholesterin der Lipoproteine mit hoher Dichte (HDL) verestert. Mit einer viel geringeren Geschwindigkeit stieg der Cholesterinanteil in den Lipoproteinen mit geringer Dichte (LDL). Es wurde deshalb vermutet, daß



Dichtediagramm der Lipoproteine und ihre Apolipoproteinzusammensetzung

die Veresterung zuerst an den HDL-Partikeln stattfindet, und als zweiter Schritt ein Austausch von Cholesterin und Cholesterinester zwischen den verschiedenen Lipoproteinfraktionen mit weiterer Veresterung erfolgt.

Die Untersuchungen über die Substratspezifität ergaben eine maximale Aktivität des Enzyms bei einem molaren Verhältnis von 4 : 1 von Phosphatidylcholin zu Cholesterin, wie es in der HDL-Fraktion vorkommt (FIELDING und Mitarbeiter[6] 1972). Dabei ist die Präsens von Apolipoprotein A-I, dem Hauptpolypeptid der HDL, als Cofaktorprotein nötig (FIELDING und Mitarbeiter[7] 1972).

Chemische Modifikationen des Phosphatidylcholins oder Cholesterins, die im normalen menschlichen Serum nicht vorkommen, zeigen unterschiedliche Veresterungsraten. Dabei müssen die Phosphorlipide ein basisches Stickstoffatom enthalten, damit sie umgesetzt werden (FIELDING[8] 1974). Wird das Cholesterin durch Demosterol oder ß-Sitosterol oder Cholecalciferol (Vitamin D_3) ersetzt, so werden nur die ersten beiden verestert, das Demosterol sogar besser als Cholesterin (NORDBY und NORUM[9] 1975).

Die Untersuchungen von Glomset[2] ließen vermuten, daß die Fettsäure von der ß-Position des Phosphatidylcholins stammt. Jedoch ergaben neuere Ergebnisse (ASSMANN und Mitarbeiter[10] 1977), daß auch die Fettsäure in der alpha-Position die übertragene Acylgruppe sein kann.

Neben der Bestätigung des Apolipoproteins A-I als Cofaktorprotein fanden SOUTAR und Mitarbeiter[11] 1975, daß auch das Apolipoprotein C-I, ein Polypeptid, das in der HDL und in Lipoproteinen sehr geringer Dichte (VLDL)

vorkommt, eine leichte Cofaktoreigenschaft besitzt. Dieselben Autoren beschrieben eine hohe Aktivität des Enzyms, wenn in der alpha-Position des Phosphatidylcholins eine gesättigte und in der ß-Position eine ungesättigte Fettsäure vorkommt. Von KOSTNER[12] 1974 wurde Apolipoprotein D aus HDL als alleiniges Cofaktorprotein beschrieben.

1.2. Physiologische Bedeutung des Enzyms

Die Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase findet man im Serum vieler Säugetiere (STOKKE[13] 1973). Andere Enzyme, die Cholesterin verestern können, wie die mikrosomale Acyl-CoA-Cholesterin-Acyltransferase (ACAT; EC 2.3.1.26) und die lysosomale saure Cholesterinesterase (EC 3.1.1.13), die in der Leber verschiedener Spezies vorkommen, zeigen beim Menschen in der Leber nicht die Fähigkeit, Cholesterin zu verestern, jedoch können sie in menschlichen Fibroblastenkulturen Cholesterin verestern (GOLDSTEIN und Mitarbeiter[14] 1974).

Der beim Menschen im Serum vorhandene Cholesterinester wird somit fast ausschließlich durch die Reaktion der Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase aus Phosphatidylcholin und Cholesterin gebildet. Lediglich ein kleiner Anteil (ungefähr 10 %) wird in den Mucosazellen des Dünndarms synthetisiert und erreicht das Plasma mit den Lipoproteinen, die exogene Triglyzeride transportieren (NORUM und Mitarbeiter[15] 1972). Das LCAT-Enzym wird zwar in der Leber synthetisiert, jedoch ist es nur im Plasma enzymatisch aktiv (OSUGA und PORTMANN[16] 1971).

Die Notwendigkeit dieser enzymatischen Reaktion für den Menschen haben die Untersuchungen bei den extrem seltenen Fällen mit familiärem LCAT-Mangel gezeigt. Diese Enzymdefizienz wurde zuerst bei norwegischen Patienten beschrieben (siehe Übersichtsartikel Norum und Mitarbeiter[15]). Alle von dieser Krankheit Betroffenen zeichneten sich durch einen sehr niedrigen Cholesterinestergehalt des Serums aus. Alle Lipoproteinklassen waren in ihrer Zusammensetzung verändert, da das Fehlen von Cholesterinester den nomalen Aufbau der Lipoproteine verhindert.

Normale HDL-Partikel waren nicht nachweisbar, und alle anderen Lipoproteinklassen zeigten eine sehr heterogene Population. Eine Reihe von Partikeln, z.B. geldrollenartig angeordnete Scheiben in der HDL-Fraktion, werden im Serum gesunder Normalpersonen nicht gefunden. Die Apolipoproteine waren zum Teil deutlich reduziert und verteilten sich auf die einzelnen Lipoproteinklassen anders als im Normalfall. Auf Grund des Enzymmangels treten Ablagerungen von Cholesterin in der Kornea, Anämien und Nierenfunktionsstörungen auf.

Die Untersuchungen von UTERMANN und Mitarbeitern[17,18,19] an Patienten mit familiärem LCAT-Mangel aus Sardinien zeigten zusätzlich das Auftreten zweier abnormer Lipoproteine, Lp-E und Lp-X.Das Lipoprotein E wurde im Dichtebereich der HDL_2 nachgewiesen und besaß als Hauptapolipoprotein das Apo-E, das normalerweise fast nur in der VLDL vorkommt. Das Lp-X ließ sich in der LDL-Fraktion nachweisen.

Viele dieser Abnormitäten findet man auch bei Patienten, die an schweren Leberfunktionsstörungen leiden und die deshalb einen sekundären LCAT-Mangel haben (Utermann und Mitarbeiter[18]).

Die Lipoproteine, die im Serum eines Patienten mit familiärer LCAT-Deficienz zirkulieren, sind mit dem Enzym nie in Berührung gekommen und stellen somit ein Modell zur Untersuchung des Einflusses der LCAT und der Bedeutung des Cholesterinesters für den Aufbau des "Kernlipids" der Lipoproteine und für den Cholesterinmetabolismus dar.

Modellversuche zur Rolle der LCAT wurden von HAMILTON und Mitarbeitern[20] an perfundierten Rattenlebern durchgeführt. Dabei traten nach Inhibition der LCAT mit 5,5'-Dithiobisnitrobenzoesäure ähnliche abnorme Lipoproteine im Perfusat auf, wie bei der LCAT-Defizienz. Die HDL-Fraktion war charakterisiert durch geldrollenartig angeordnete Scheiben, die als Hauptapolipoprotein Apo E enthielten. Da diese Lipoproteine sehr schnell von der reaktivierten LCAT umgesetzt wurden, sahen die Autoren diese als "Precursor" für die normalen HDL-Partikel an. Sie folgerten unter anderem daraus, daß das Apo E bei der Ratte zusammen mit der LCAT eine zentrale Stellung im Cholesterinmetabolismus einnimmt.

1.3. Bisherige Versuche zur Reinigung der LCAT

Bei den biochemischen Untersuchungen von Patienten mit familiärer LCAT-Defizienz in unserem Arbeitskreis stellte sich die Frage, ob es möglich sei, durch eine in vitro Substitution mit hoch gereinigtem Enzym die Veränderungen des Lipoproteinspektrums bei diesen Patienten rückgängig zu machen. Die Enzymreaktion sollte in vitro im Serum eines dieser Patienten ablaufen, da sie auch normalerweise im Serum oder Plasma des Menschen stattfindet.

Um sekundäre Effekte durch andere Proteine bei der in vitro Substitution auszuschließen, wurde eine hoch gereinigte Enzympräparation benötigt,die frei von Verunreinigungen war.

Als ich 1974 mit dieser Aufgabe begann, gab es nur wenige Versuche, die Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase zu reinigen. FIELDING und FIELDING[21] 1971 und Fielding[8] 1974 reinigten das Enzym 2500 bis 6000-fach mit einer 10 - 20 %-igen Ausbeute durch eine Kombination von Ammoniumsulfatpräzipitation, Ultrazentrifugation und Absorptionschromatographie. AKANUMA und GLOMSET[22] 1968 berichteten von einer 1200-fachen Reinigung, bei der sie ähnliche Methoden zusammen mit Ionenaustauscher- und Affinitätschromatographie benutzten. LACKO und Mitarbeiter[23] 1974 beschrieben eine 4000-fache Reinigung bei einer 5 %-igen Ausbeute.

Alle diese Autoren zeigten nicht die Reinheit ihrer Präparation, weder diskelektrophoretisch noch immunologisch. Auch eine Aminosäurezusammensetzung oder das Molekulargewicht konnte nicht angegeben werden. Somit war es nötig, für die in vitro Substitution eine bessere Methode zu entwickeln, um ein hochgereinigtes Enzym zu erhalten.

In der vorliegenden Dissertation beschreibe ich eine Methode zur Reinigung der Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase sowie die Eigenschaften dieses Enzyms.

2. Aktivitätsbestimmung der Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase

2.1. Testmethoden

Um den Fortgang der Reinigung der Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase zu verfolgen und die Aktivität des Enzyms bei normalen und pathologischen Seren zu bestimmen, war eine Methode notwendig, die diesen Anforderungen hinlänglich genügte.

Im Augenblick sind hauptsächlich zwei Testmethoden in Gebrauch. Nach STOKKE und NORUM[24] wird das Humanserum zur LCAT-Bestimmung mit ^{3}H- oder ^{14}C-markiertem Cholesterin in einer Humanalbuminlösung präinkubiert. Zur Inhibition der LCAT-Reaktion wird 5,5'-Dithiobisnitrobenzoesäure (DTNB) hinzugefügt. Zur Reaktivierung des Enzyms wird ß-Mercaptoäthanol zum Reaktionsgemisch gegeben und nach einiger Zeit die Menge an radioaktivem Cholesterinester gemessen, woraus sich die Aktivität des Enzyms bestimmen läßt.

Die andere Methode wurde von GLOMSET und WRIGHT[25] entwickelt. Zu einem hitzeinaktivierten Humanserumpool (+ 56° C) gibt man radioaktiv markiertes Cholesterin in Humanalbuminlösung sowie die zu messende Probe. Nach der Inkubation wird der entstandene radioaktive Cholesterinester bestimmt. Daraus kann die Enzymaktivität der Probe ermittelt werden.

Neben diesen Methoden, die radioaktiv markiertes Substrat benutzen, kann man auch die Zunahme von Cholesterinester nach langer Inkubation des Humanserums mit Hilfe der Gaschromatographie messen (BLOMHOFF[26] 1974).

Alle diese Verfahren haben ihre Vor- und Nachteile. Die Hitzedenaturierung des Enzyms, die im Glomset-Wright-Test angewandt wird, kann auch zu unkontrollierbaren Veränderungen der Lipoproteine führen, die das Substrat für das Enzym bilden. Werden dagegen die homologen Lipoproteine als Substrat verwendet, kann dieses Testverfahren bei abnormaler Zusammensetzung der Lipoproteine zu Fehlbestimmungen führen, da dann Lipid-Zusammensetzung und Cofaktoren von der Norm abweichen können.

Ich habe deshalb die Methode nach Glomset und Wright mit einigen Modifikationen angewandt, da bei der Reinigung des Enzyms die Substrate und Cofaktoren entfernt werden und eine Messung der Enzymaktivität in der Probe nicht mehr möglich ist.

2.2. Versuche zur Linearitätsbestimmung der LCAT-Reaktion

Wird bei der Enzymreaktion nach bestimmten Zeiten die Cholesterinesterzunahme gemessen, so zeigt sich, daß die Reaktion bis zu einer Veresterungsrate von 5 % linear verläuft (Abbildung 1).

Dabei ist es ohne Bedeutung, ob man Humanserum oder unterschiedliche Mengen an gereinigter LCAT als Enzymquelle benutzt. Bei längerer Inkubationszeit ergibt sich eine geringere Steigung der Geraden. Diese Tatsache läßt sich durch die gute Substratquelle, die die Lipoproteine mit hoher Dichte (HDL) für die LCAT-Reaktion bei diesem Testverfahren am Anfang der Inkubation bilden, erklären.Als zweiter Schritt werden die Lipide zwischen den verschiedenen Lipoproteinklassen ausgetauscht, und

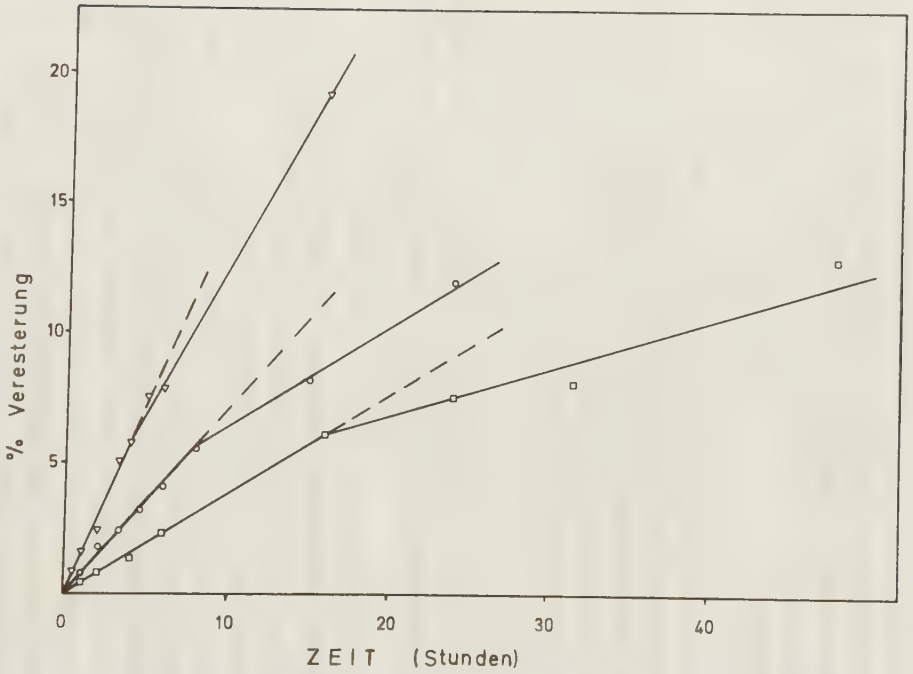


Abbildung 1: Zeitdiagramm der LCAT-Reaktion (▫—▫) 1o µl gereinigte LCAT, (○—○) 50 µl Humanserum und (▽—▽) 40 µl gereinigte LCAT

das neue Cholesterin, das in die HDL inkorporiert wird, kann verestert werden (NORUM[27] 1974).

Bei der Bestimmung der Aktivität von Humanserum und den Proben bei den verschiedenen Reinigungsschritten muß darauf geachtet werden, daß innerhalb der Inkubationszeit eine Veresterungsrate von 5 % nicht überschritten wird.

2.3. Aktivitätsbestimmungen bei normalen Personen und Patienten mit primärer und sekundärer LCAT-Defizienz

Die Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase-Aktivität bei einer größeren Anzahl (n = 40) gesunder Normalpersonen schwankt innerhalb gewisser Grenzen. Es ergibt sich ein Durchschnittswert von 0,76 mU/ml Humanserum mit einer Standardabweichung von $\pm$ 0,11 mU/ml (Abbildung 2).

Die Aktivitäten bei Leberkrankheiten sind häufig erniedrigt und können in Fällen schwerster Leberschädigungen fast den Wert o,o mU/ml erreichen, ähnlich wie bei der primären LCAT-Defizienz (Tabelle 1). Bei den Untersuchungen der Patienten mit familiärer LCAT-Defizienz konnten jedoch keine begleitenden Leberschäden festgestellt werden (Utermann und Mitarbeiter[17,18]).

Tabelle 1: LCAT-Aktivität von Patienten mit primärem und sekundärem LCAT-Mangel

Patienten	LCAT-Aktivität mU/ ml
G.M.[a]	0,065
P.M.[a]	0,13
K.K.[b]	0,33
H.H.[b]	0,16
A.M.[b]	0,38
H.T.[c]	0,02
D.T.V.[c]	0,02
Normale Kontrollen	0,76 $\pm$ 0,11

a. Patienten mit familiärer LCAT-Defizienz
b. Patienten mit Leberschäden unterschiedlicher Schwere
c. Patienten mit Leberkarzinom

Bei den LCAT-Aktivitätsbestimmungen der Verwandten der Brüder G.M. und P.M., die in Zusammenarbeit mit G. Utermann und P. Dieker durchgeführt wurden, konnte die Genetik der LCAT-Defizienz in dieser Familie aufgeklärt werden. Man kann zwischen drei Gruppen von Familienangehörigen unterscheiden (Abbildung 2). Die erste Gruppe (n = 17) zeichnete sich durch einen Durchschnittswert der LCAT-Aktivität von o,72 mU/ml aus, welcher im Bereich der Normalwerte liegt. Die nächste Gruppe (n = 13) ist charakterisiert durch eine fast um die Hälfte erniedrigte LCAT-Aktivität. Die letzte Gruppe bilden die beiden Brüder G.M. und P.M.

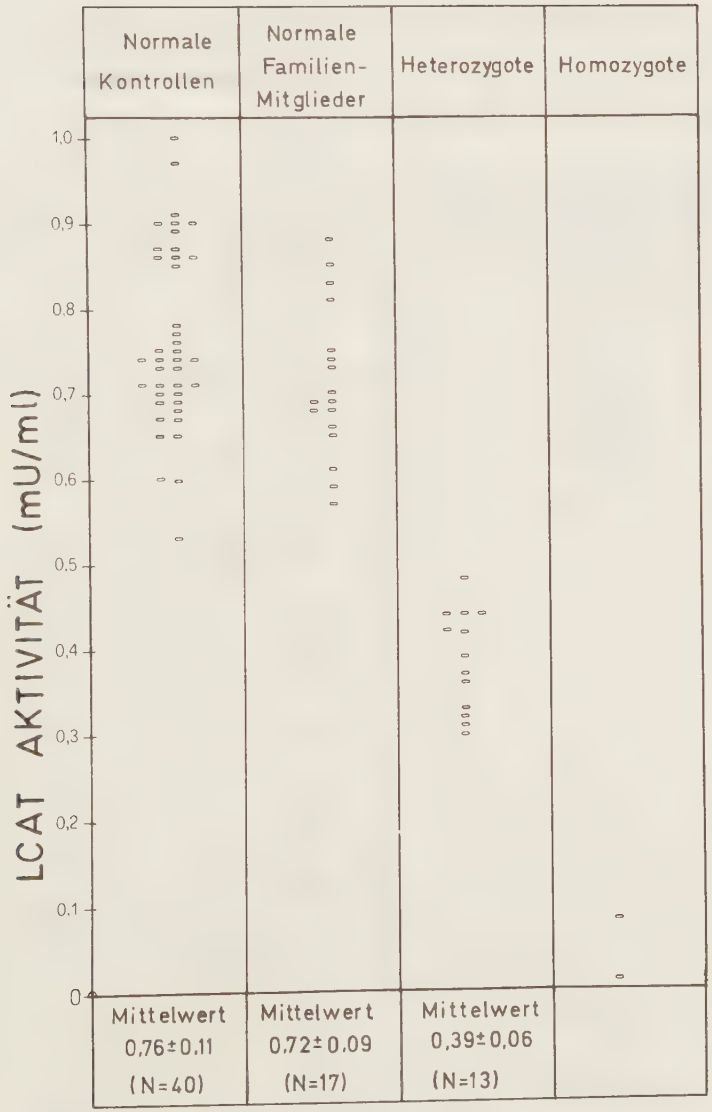


Abbildung 2: Enzymwerte von Normalpersonen und Mitgliedern der M. Familie

Bei einer Analyse des Stammbaums dieser Patienten zeigte sich, daß der Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase-Defizienz ein autosomal rezessiver Erbgang zugrunde liegt (Abbildung 3).

Die obligat heterozygoten Familienmitglieder haben eine um die Hälfte erniedrigte Enzymaktivität. Diese sind die Eltern der beiden homozygot kranken Brüder und das Kind des einen Bruders, P.M..

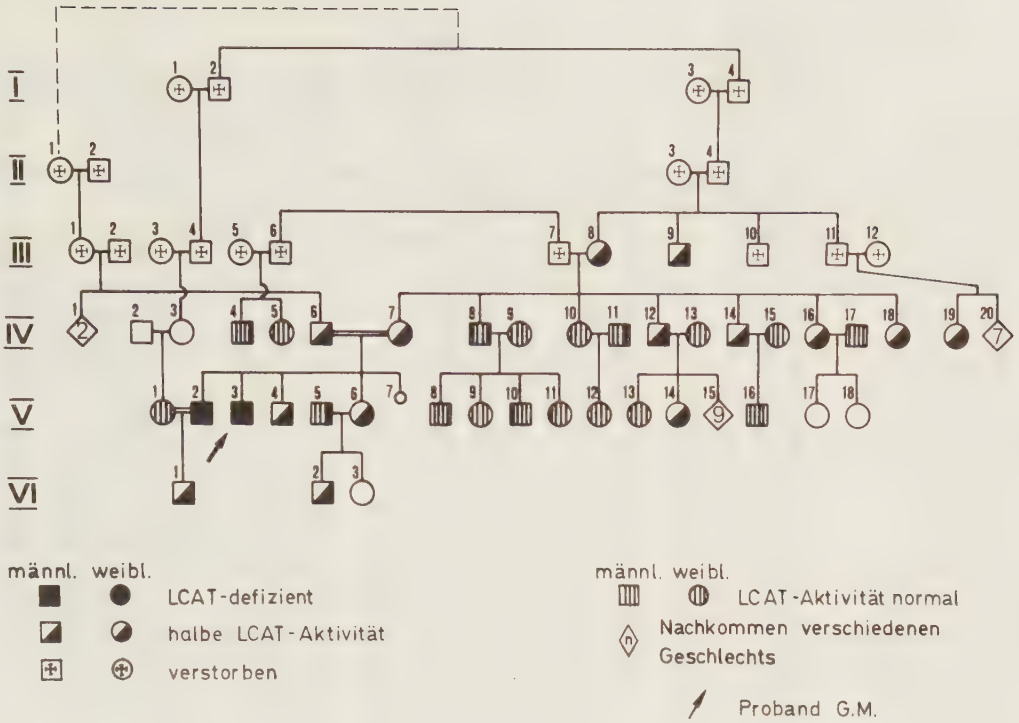


Abbildung 3: Stammbaum der M.-Familie über sechs Generationen

3. Isolierung des Enzyms aus menschlichem Plasma

Zur Reinigung der LCAT wurden jeweils 600 - 800 ml tiefgefrorenes menschliches Plasma (- 20° C) verwandt. Wird die Kühlkette von der Blutentnahme bis zum Gebrauch nicht unterbrochen, so ist der Aktivitätsverlust über mehrere Monate nur gering.

Nach dem Auftauen des Plasmas wurden mögliche Präzipitate abzentrifugiert und der Überstand für die Enzympräparation verwandt. Die Ergebnisse der einzelnen Reinigungsschritte sind in Tabelle 2 zusammengefaßt.

Zuerst wurde das Plasma mit festem Ammoniumsulfat zu 35 % gesättigt. Der resultierende Niederschlag wurde nach Zentrifugation verworfen und zu dem Überstand erneut $(NH_4)_2 SO_4$ gegeben, um eine 65 %-ige Sättigung zu erreichen. Der danach entstandene Niederschlag wurde nach dem Abzentrifugieren für den nächsten Schritt gegen 0,5 mM ÄDTA-Puffer und 0,01 M ß-Mercaptoäthanol dialysiert (16 Std.).

Die Ammoniumsulfatfällung führte nur zu einer 2-fachen Anreicherung des Enzyms, wobei vornehmlich Teile von Immunglobulinen, Fibrinogen und Albumin eliminiert wurden. Der Vorteil dieser Methode ist die starke Reduzierung des Volumens der Enzymlösung, wodurch der nächste Schritt, die Ultrazentrifugation, erst möglich wird, da die hierzu benutzten Rotoren nur ein geringes Volumen aufnehmen können.

Für die Ultrazentrifugation wurde die Salzdichte des Dialysats mit festem KBr auf eine Dichte von d = 1,21 g/ ml

Tabelle 2: Reinigung der Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase

Fraktion	Gesamt Volumen (ml)	Gesamt Aktivität (mU)	Gesamt Protein (mg)	Spezifische Aktivität (mU/mg)	Ausbeute %	Anreicherung (fach)
Plasma	700	504	49000	0,01	100	1
Ammoniumsulfat-Präzipitation	166	455	21200	0,02	90	2
Fraktion A >1,21 g/ ml Ultrazentrifugation	104	264	460	0,58	52	58
Fraktion B >1,21 g/ ml + 1,5 mM Natriumtaurocholat Ultrazentrifugation	103	259	317	0,81	51	81
Peak I Hydroxylapatit	55	148	1	148	29	12400
Anti-apo D-Affinitäts-säulen Eluat	11	101	0,5	153	20	15000

erhöht und diese Lösung 30 Stunden lang bei 315 000 x g ultrazentrifugiert . Von diesem Schritt an enthalten alle Lösungen für die Isolierung des Enzyms 1,0 mM Dithioerythritol (DTE) , um eine Oxidierung der freien SH-Gruppen des LCAT-Proteins zu verhindern, falls nicht ausdrücklich etwas anderes beschrieben wird.

Nach der ersten Ultrazentrifugation kann man in den Zentrifugenröhrchen drei Zonen unterscheiden: oben die flotierten Lipoproteine, dann eine klare Zwischenzone und unten die Hauptmenge der Plasmaproteine. Die Zwischenzone (Fraktion A Tabelle 2) enthält einen großen Teil des Enzyms ohne Verunreinigungen in einem Ausmaß, wie die anderen Regionen.

Die LCAT ist nach dieser Prozedur noch an Lipoproteinpartikeln mit sehr hoher Dichte (VHDL) assoziiert und kann durch eine zweite Ultrazentrifugation in Gegenwart von 1,5 mM Natriumtaurocholat davon abgespalten werden (vergleiche Akanuma und Glomset[22] 1968).

Nach dem Verwerfen der hierbei flotierenden Lipoproteine wurde der Rest des Inhalts der Zentrifugenröhrchen (Fraktion B Tabelle 2) ausgiebig dialysiert. Es hat sich während meiner Untersuchungen gezeigt, daß es sehr wichtig ist, bei der Ultrazentrifugation die Volumina einzuhalten, die in Tabelle 2 angegeben sind. Verdünnt man nicht zwischendurch immer wieder die zu zentrifugierenden Lösungen, so wird die Enzympräparation aufgrund einer daraus resultierenden schlechten Trennung stark von anderen Proteinen verunreinigt.

Nach der Dialyse wird die Enzymlösung durch Ultrafiltration konzentriert und mittels Affinitätschromatographie an Hydroxylapatit von fast allen anderen Proteinen gereinigt (Abbildung 4).

Der dabei zuerst eluierte Peak (Peak I Hydroxylapatit) enthält neben der Hauptmenge an Enzym noch Apo D, welches nur immunologisch noch nachweisbar ist (Abbildung 7). Um eine endgültige Reinigung zu erreichen, wurde die Enzymlösung nochmals ultrafiltriert und umgepuffert. Das Dithioerythritol wurde durch Zugabe von 5,5'- Dithiobisnitrobenzoesäure inaktiviert.

Danach konnte der letzte Schritt der Reinigung durchgeführt werden, eine Absorptionschromatographie an einer Sepharosesäule, die kovalent gebundene Antikörper gegen Apo D besitzt. Durch die Inaktivierung von DTE durch DTNB kann eine Behinderung der Antikörper-Antigen-Reaktion, die sonst durch Dithioerythritol hervorgerufen wird, nicht stattfinden.

Die bei diesem Arbeitsgang gereinigte Fraktion (Anti-apo-D-Affinitätssäulen Eluat) enthält als nachweisbare Proteinkomponente nur noch die Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase, die im folgenden Abschnitt auf ihre Reinheit untersucht und charakterisiert wird.

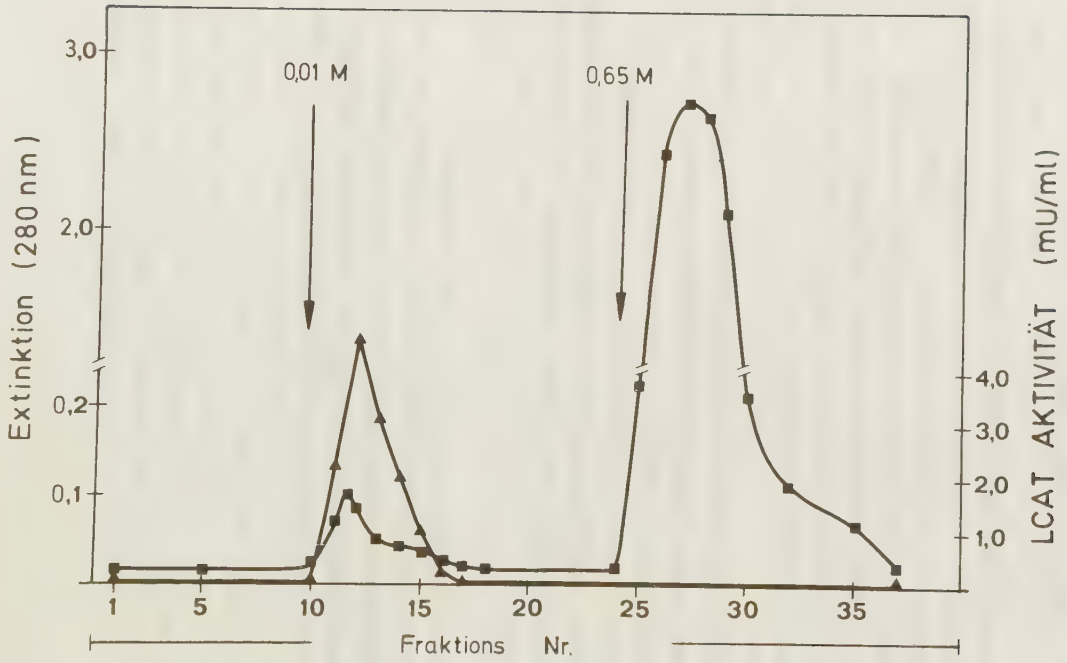


Abbildung 4: Hydroxylapatitaffinitätschromatographie der Fraktion B. Die Pufferwechsel sind durch Pfeile markiert. (■——■) Extinktion bei 280 nm und (▲——▲) LCAT-Aktivität.

4. Eigenschaften der Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase

4.1. Reinheitsbestimmungen

Eine Standardmethode zur Reinheitsprüfung von Proteinen ist die Elektrophorese in Polyacrylamidgelen (ORNSTEIN[28] und DAVIS[29] 1964). Leider zeigt die gereinigte LCAT im üblichen Polyacrylamidsystem kaum einen Unterschied in der elektrophoretischen Beweglichkeit gegenüber Apolipoprotein A-I und Humanalbumin, die als Hauptverunreinigungen vorkommen können.

Nach dem Zusatz von 0,5 mM Natriumtaurocholat zu den Gelen und zum oberen Elektrophoresepuffer kann man dagegen deutlich die Reinheit der Enzympräparation erkennen (Abbildung 5).

Um die Identität dieser Proteinbande mit der LCAT zu beweisen, wurde ein Gel nach der Elektrophorese, der Länge nach zerschnitten. Eine Hälfte wurde mit Comassie brillant blue gefärbt, die andere in einzelne Segmente getrennt und diese direkt im LCAT-Test inkubiert und somit die Enzymaktivität gemessen. Es ergab sich dabei kein Unterschied der Lage der Proteinbande und der LCAT-Aktivität (Abbildung 5).

Ein anderes Verfahren zur Reinheitsprüfung ist die Immunodiffusion gegen Antikörper nach OUCHTERLONY[30] 1958. Die verschiedenen Kaninchenantiseren wurden in unserem Labor in Zusammenarbeit mit Dr.Münscher von den Behring-Werken,Marburg, hergestellt. Die saubere Enzympräparation zeigte keine Reaktion gegen Antiseren gegen Apolipoproteine B, A-I, A-II, D, E,und C sowie gegen Humanalbumin (Abbildung 6).

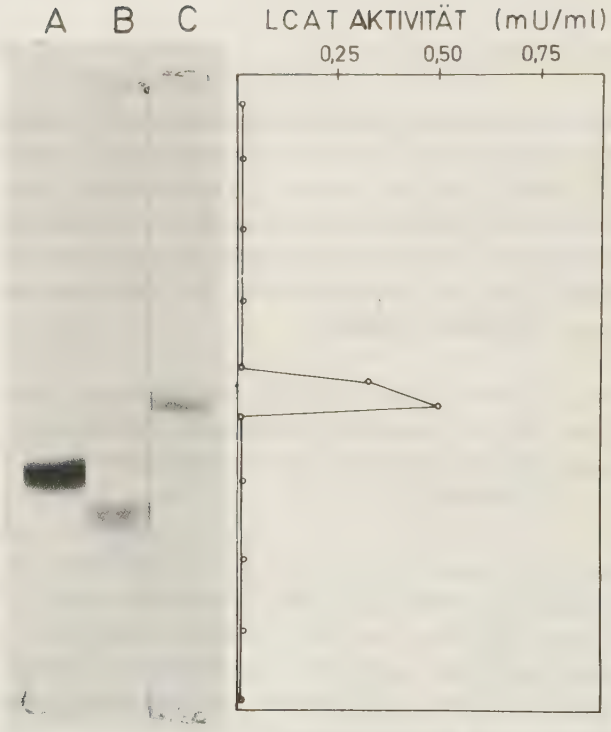


Abbildung 5: Diskelektrophorese in Gegenwart von 0,5 mM Natriumtaurocholat. (A) Humanalbumin, (B) Apo D und (C) gereinigte LCAT

Im Ouchterlony-Test gegen ein unspezifisches Anti-LCAT-Serum erhält man nur einen Präzipitationsbogen mit der gereinigten LCAT-Fraktion.

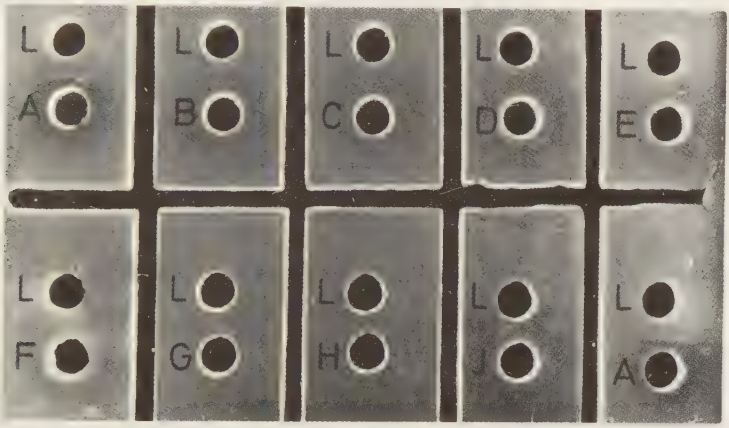


Abbildung 6: Ouchterlony-Test der gereinigten LCAT (L) gegen Kaninchenantiserum. (A) Anti-LCAT; (B) Anti-Apo D; (C) Anti-Humanalbumin; (D) Anti-Apo A-I; (E) Anti-Apo A-II; (F) Anti-Apo B; (G) Anti-Apo E; (H) Anti-Apo C und (J) Anti-Apo C-I.

Vor der Immunabsorption enthält Peak I der Hydroxylapatit-chromatographie neben der LCAT noch Apo D (Abbildung 7). Die Reaktionen des Antiserums werden durch zwei gleichzeitig vorhandene Antikörper gegen Apo D und gegen LCAT hervorgerufen.

Abbildung 7: Ouchterlony-Test gegen ein polyspezifisches Anti-LCAT-Serum (M). (A) Peak I Hydroxylapatit; (B) Apo D und (C) gereinigte LCAT

4.2. Molekulargewichtsbestimmungen

Um das Molekulargewicht eines Proteins zu bestimmen, werden meistens Gelchromatographie und Elektrophorese in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat (SDS) nach WEBER und OSBORN[31] 1969 angewandt.

Die Gelchromatographie der gereinigten LCAT an Ultrogel Ac 34 zeigt die Identität eines Peaks bei der Messung der Extinktion bei 280 nm und des Peaks der Enzymaktivitätsbestimmung (Abbildung 8). Vergleicht man die Lage dieser Peaks mit den Elutionsvolumina verschiedener Proteine nach Gelchromatographie unter identischen Bedingungen, so entspricht diese einem Molekulargewicht von 67000 $\pm$ 2000 (Abbildung 9).

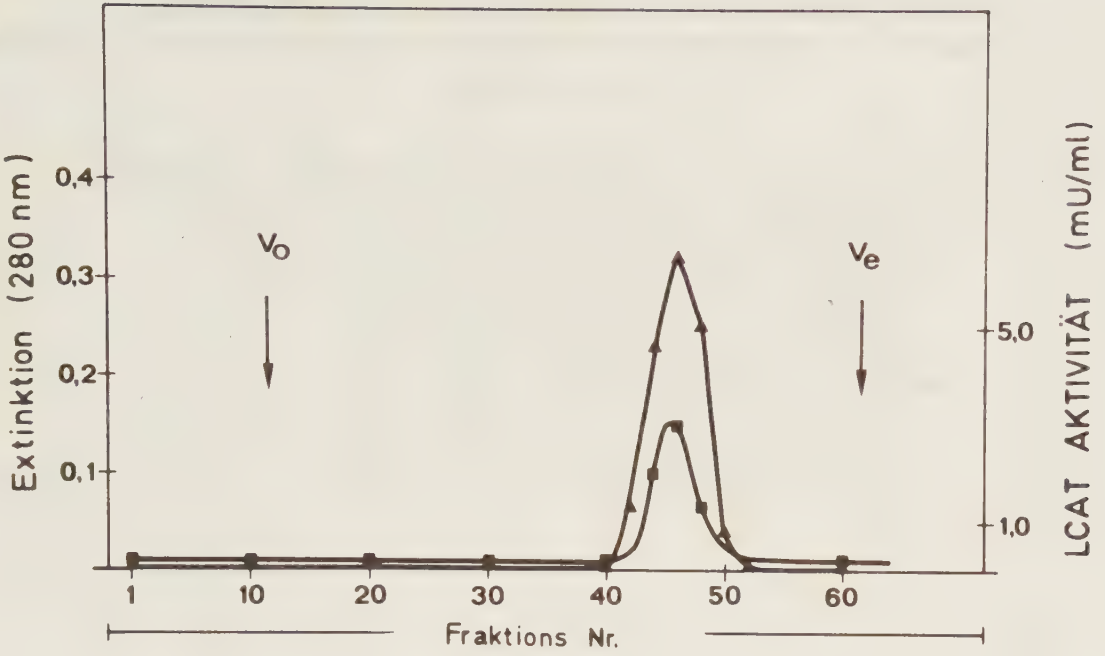


Abbildung 8: Gelchromatographie von gereinigter LCAT an Ultrogel Ac 34. (■——■) Extinktion bei 280 nm und (▲——▲) LCAT-Aktivität.

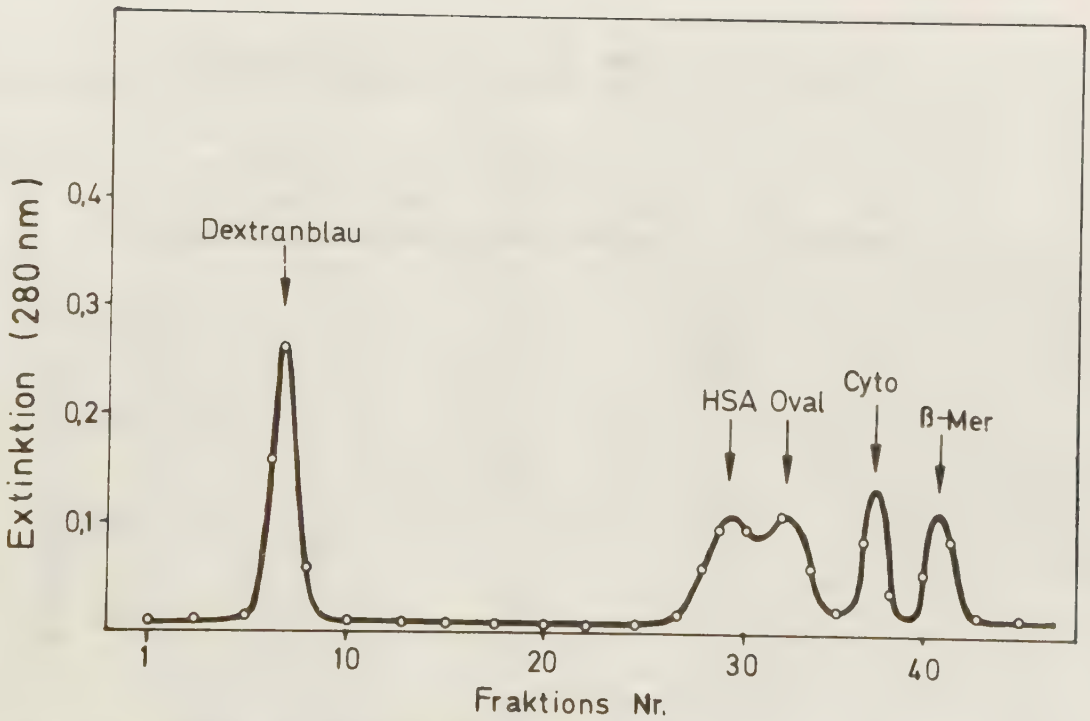


Abbildung 9: Gelchromatographie von Eichproteinen an Ultrogel Ac 34. HSA = Humanserumalbumin; Oval= Ovalbumin; Cyto= Cytochrom C und ß-Mer= ß-Mercaptoäthanol

Die Ergebnisse der SDS-Elektrophorese der sauberen LCAT zeigen nur eine Proteinbande, deren elektrophoretische Mobilität der des Humanalbumins entspricht (Abbildung 10). Die Molekulargewichtsbestimmung ergab hier bei zehn unabhängigen Elektrophoresen einen Wert von 67000 $\pm$ 3000.

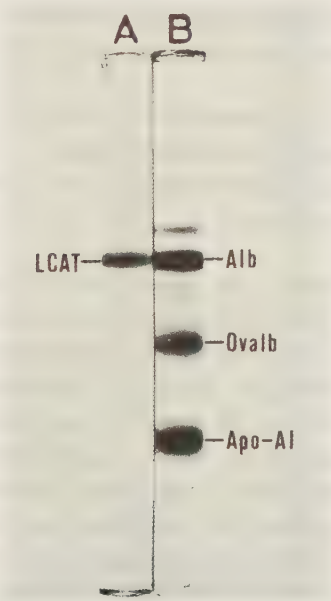


Abbildung 10: SDS-Polyacrylamidelektrophorese nach Weber und Osborn von (A) gereinigter LCAT und (B) von Humanalbumin (Alb); Ovalbumin (Ovalb) und Apo A-I

4.3. Weitere Eigenschaften des Enzyms

Um ein sauberes Protein von anderen zu unterscheiden, wird seine Aminosäurezusammensetzung mit der anderer verglichen. Im vorliegenden Fall wurde dazu die gereinigte Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase gegen Wasser dialysiert und mit 6 N HCl hydrolysiert. Nach Trocknung des Hydrolysats wurden die Aminosäuren im Aminosäureanalysator getrennt und identifiziert.

Die Identifizierung und Mengenbestimmung konnte mit Hilfe eines Aminosäurestandardgemisches, das unter gleichen Bedingungen chromatographiert wurde, durchgeführt werden (Tabelle 3).

Das Cystein wurde immer als Cysteinsäure bestimmt, da es bereits nach der Hydrolyse oxidiert war. Durch eine Perameisensäureoxidation wurden Methionin und Cystein in Methioninsulfon bzw. in Cysteinsäure umgewandelt. Die Aminosäuren wurden mit und ohne Perameisensäureoxidation analysiert. Dabei ergaben sich keine wesentlichen Unterschiede in der Aminosäurezusammensetzung. Alle normalerweise vorkommenden Aminosäuren sind vorhanden, und die Aminosäurezusammensetzung unterscheidet sich deutlich von der des Apolipoprotein A-I, Apolipoprotein D und des Humanalbumins.

Zur Bestimmung des isoelektrischen Punktes wurde das Enzym in Gegenwart von Ampholinen (LKB) elektropherografiert. Der pH-Gradient wurde durch Ampholine des pH-Bereiches 3,5 - 5,0 aufgebaut, als Träger diente ein Flachgel aus Polyacrylamid. Nachdem der pH-Gradient sich im elektrischen Feld gebildet hatte, wurde die Enzymlösung mit Hilfe von Papierstreifen aufgetragen,

Tabelle 3: Aminosäurezusammensetzung in Mol pro 100 000 g Protein

Aminosäuren	LCAT	Apo D[32]	Apo A-I[33]	Humanserumalbumin[34]
Lys	37,3	61	74	23
His	37,5	10	18	82
Arg	53,8	19	56	35
Asp	62,1	101	74	79
Thr	36,8	50	35	42
Ser	65,3	34	49	35
Glu	81,3	94	166	118
Pro	47,1	52	35	44
Gly	98,2	32	35	21
Ala	61,3	46	67	-
Cys-SO_3	6,1	19	-	52
Val	44,3	55	46	66
Met	3,2	10	11	9
Ileu	27,4	48	-	13
Leu	77,9	65	138	90
Tyr	27,2	26	25	25
Phe	48,3	18	21	47

und das Protein wanderte im wiederangelegten elektrischen Feld bis zu einer Stelle, wo der pH-Wert seinem isoelektrischen Punkt entsprach.

Vorversuche zeigten, daß es unvorteilhaft war, das Enzym vor der Elektrophorese mit der Ampholinelösung zu mischen, da dabei die Bestimmung des isoelektrischen Punktes unreproduzierbar war. Trug man die Enzymprobe in der Nähe der Anode auf, so ergab sich keine klare Position einer Proteinbande.

Das Auftragen des Enzyms in der Mitte oder am kathodischen Ende des pH-Gradienten führte dagegen zu einem wiederholbaren identischen Muster (Abbildung 11).

Eine Bestimmung der Enzymaktivität in den einzelnen Proteinbanden ergab eine Verteilung der Aktivität über alle Banden. Daraus kann man folgern, daß das Enzym Mikroheterogenität mit drei Hauptbanden zeigt, deren isoelektrischer Punkt bei pH 4,28 , 4,33 bzw. 4,37 liegt.

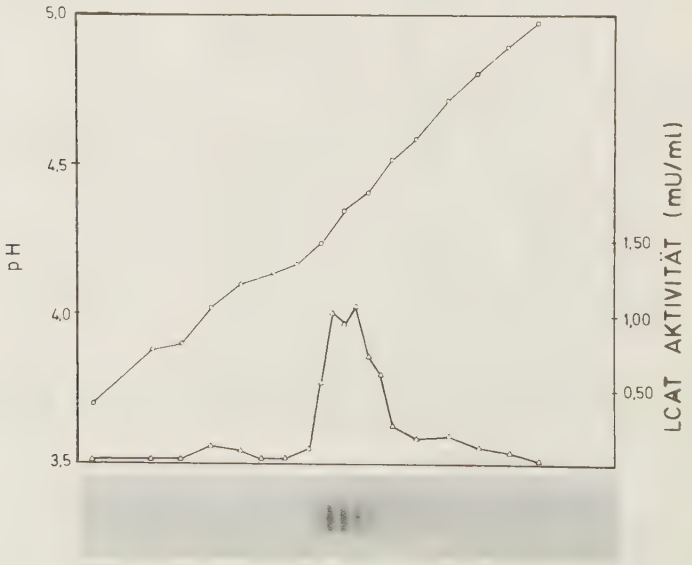


Abbildung 11: Isoelektrische Flachgelfokussierung der gereinigten LCAT. (○——○) pH-Gradient und (△——△) LCAT-Aktivität.

5. Charakterisierung eines Antiserums gegen LCAT

Durch intravenöse und subkutane Injektion von sauberer LCAT in Kaninchen kann man nach mehreren Wochen ein Serum gewinnen, das mit dieser Fraktion im Ouchterlony-Test ein Immunpräzipitat bildet (Abbildung 7).

Dieses Antiserum bildet aber auch Präzipitate mit Apolipoprotein D und A-I und Humanalbumin. Um zu entscheiden, ob es sich bei der Reaktion mit der LCAT nicht um eine unspezifische Nebenreaktion handelt, wurden Humanserum und gereinigte LCAT mit steigenden Mengen von Antiserum inkubiert. Der dabei ausfallende Niederschlag wurde abzentrifugiert und der Überstand auf LCAT-Aktivität ausgetestet.

Das Anti-LCAT-Serum hat die Fähigkeit, das Enzym vollständig zu inhibieren (Abbildung 12, 13). Dieses kann aber nicht durch Antikörper gegen Apolipoprotein A-I oder D erreicht werden. Bei der reinen LCAT zeigen diese Antiseren nur eine minimale Inhibition. Dagegen deutet die Abnahme der LCAT-Aktivität des Humanserums bei Zugabe dieser Antiseren auf eine teilweise Copräzipitierung des Enzyms mit den Lipoproteinen, die Apolipoprotein A-I oder D enthalten, hin.

Nach diesen Ergebnissen war es interessant zu wissen, ob sich auch im Serum eines Patienten mit familiärer LCAT-Defizienz ein Protein immunologisch nachweisen läßt, das der LCAT einer Normalperson entspricht.

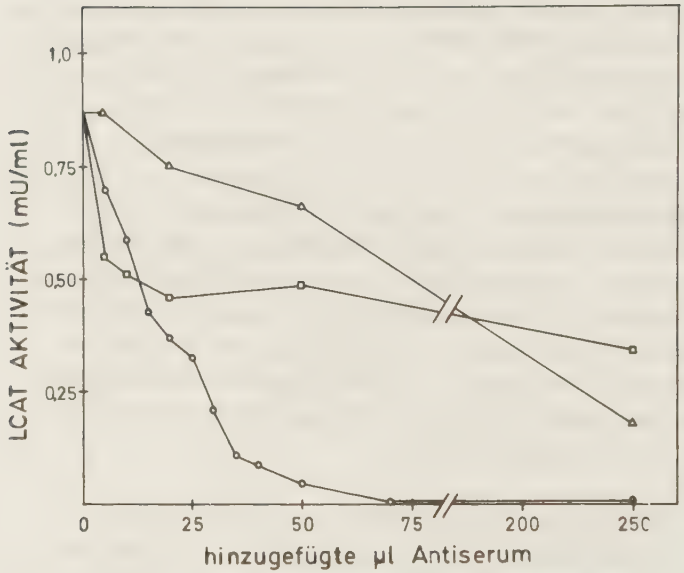


Abbildung 12: Inhibitionstest von je 50 µl Humanserum mit steigenden Mengen Antiseren. (o——o) Anti-LCAT; (□——□) Anti-Apo D und (△——△) Anti-Apo A-I.

Es wurde dazu die Eigenschaft des Anti-LCAT-Serums genutzt, die LCAT-Aktivität im normalen Humanserum zu inhibieren. Gleichbleibende Mengen von Anti-LCAT wurden mit steigenden Mengen von normalem Humanserum oder Serum eines Patienten mit familiärer LCAT-Defizienz absorbiert und der resultierende Niederschlag abzentrifugiert. Je zwei unterschiedliche Mengen jeder Absorptionsstufe wurden mit immer derselben Menge eines normalen Humanserums inkubiert und nach Zentrifugation die verbleibende LCAT-Aktivität im gesamten Überstand gemessen (Abbildung 14).

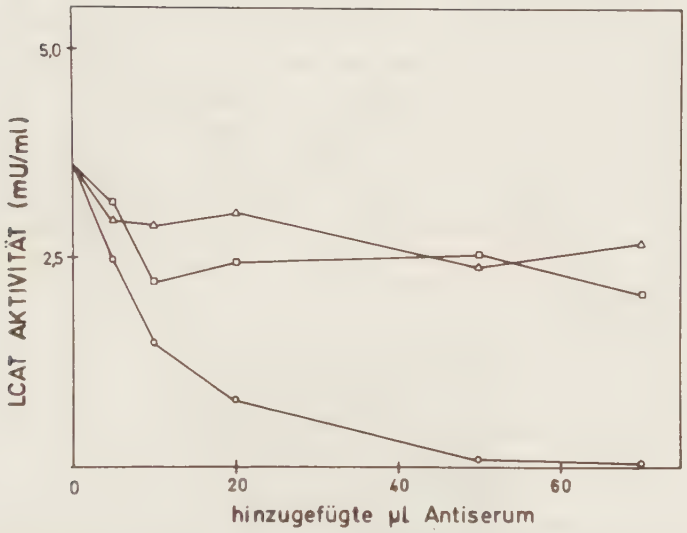


Abbildung 13: Inhibitionstest von je 5 µl gereinigter LCAT mit steigenden Mengen Antiseren. (o——o) Anti-LCAT; (□——□) Anti-Apo D und (△——△) Anti-Apo A-I.

Das Ergebnis muß folgendermaßen interpretiert werden. Das normale Humanserum ist in der Lage, aus dem Anti-LCAT-Serum Antikörper gegen LCAT zu entfernen. Danach kann der dabei resultierende Überstand die LCAT-Aktivität im normalen Humanserum nicht mehr inhibieren, und die Aktivität erreicht wieder den Normalwert. Die Antikörper können jedoch nicht durch das pathologische Humanserum ausgefällt werden, und der Überstand ist weiterhin in der Lage, die LCAT-Aktivität im Normalserum zu inhibieren.

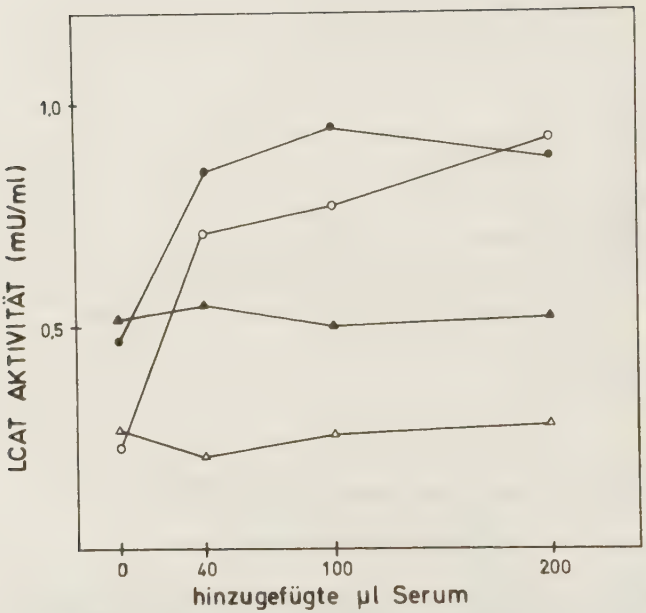


Abbildung 14: Inhibitionstest von je 50 µl Humanserum mit un- und vorabsorbiertem Anti-LCAT-Serum. Die Absorption wurde mit steigenden Mengen normalen Humanserums (Kreissymbole) und LCAT-defizienten Serums (Dreieckssymbole) durchgeführt. Die Inhibition erfolgte mit zwei verschiedenen Mengen jeder Absorptionsstufe (offene bzw. ausgefüllte Symbole).

Dieses Resultat ist ein starker Hinweis darauf, daß das Serum unseres Patienten kein Protein enthält, das immunologisch der LCAT entspricht.

Eine weitere Bekräftigung dieser Tatsache erhält man, wenn außer den Antikörpern gegen LCAT alle Unspezifitäten aus dem Antiserum durch Absorption entfernt werden. Dies geschieht durch Zugabe von LCAT-defizientem Serum zu dem Anti-LCAT-Serum. Nach Inkubation und Entfernung des Niederschlags reagiert das Antiserum immer noch mit sauberer LCAT und in voller Identität auch mit normalem Humanserum. Dagegen zeigt sich kein Präzipitat mit dem pathologischen Serum (Abbildung 15).

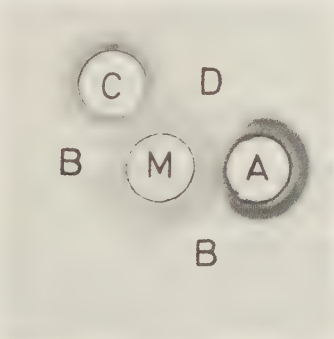


Abbildung 15: Ouchterlony-Test mit spezifischem Anti-LCAT-Serum (M). (A) Normales Human-Serum; (B) gereinigte LCAT; (C) LCAT-defizientes Serum und (D) Apo D.

6. In vitro Substitutionsversuche

Nach der Reinigung und Charakterisierung des Enzyms wurde die in vitro Substitution des Serums des Patienten G. M. vorgenommen. Dazu wurden 6 ml Serum des Patienten mit 2 ml Enzymlösung bei 37°C im Inkubationsschrank inkubiert und danach analysiert. Das Experiment wurde bisher 5 mal durchgeführt und die Zunahme an Cholesterinester variierte zwischen 3- und 100-facher Erhöhung. Dieses war bedingt durch die unterschiedliche Aktivität der verwendeten Enzymlösung, der Dauer der Inkubation (20 bis 90 Std) und der Ausgangsmenge an Cholesterin. Eine Zunahme bis zum Normalwert ist möglich.

Das pathologische Serum zeigte nach der Substitution in vieler Hinsicht Veränderungen. Zur Analyse dieser Umwandlungen wurden das substituierte Serum und die nötigen Kontrollseren im Dichtegradienten ultrazentrifugiert. Nach Fraktionierung des Gradienten wurden drei verschiedene Apolipoproteine (A-I, E und B) mittels Elektroimmunodiffusion in den einzelnen Fraktionen quantifiziert. Die Mengenangabe erfolgte in diesem Fall durch Messung der Höhe der entstandenen " Dreiecke " auf der Laurellplatte in mm.

Das normale Kontrollserum zeigt dabei drei deutliche Fraktionen (Abbildung 16). Der Apolipoprotein A-I-Peak repräsentiert die Lipoproteine hoher Dichte (HDL). Der erste Lipoprotein-B-Peak markiert die Lipoproteine geringer Dichte (LDL) und der zweite Apolipoprotein-B-Peak mit dem Apolipoprotein E zusammen die Lipoproteine sehr geringer Dichte (VLDL).

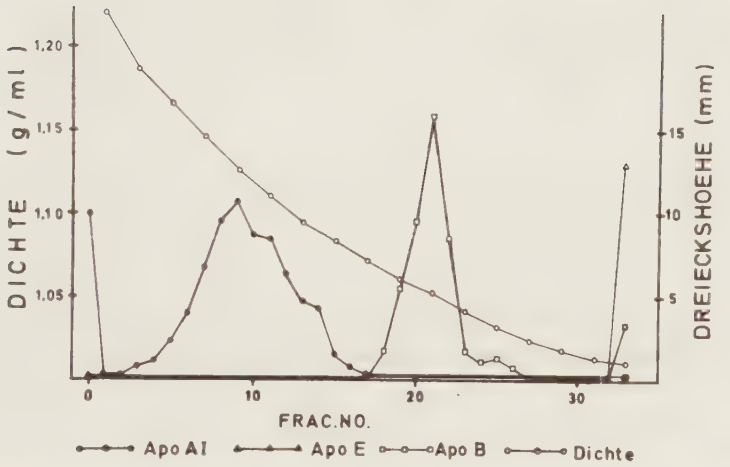


Abbildung 16: Apolipoproteinverteilung im Normalserum nach Dichtegradientenultrazentrifugation

Das pathologische Serum zeigt dagegen charakteristische Unterschiede (Abbildung 17). Das Apolipoprotein A-I ist über zwei Peaks verteilt (HDL_3 und HDL_2) und das Apo E bildet eine seperate neue Lipoproteinfraktion (Lp-E [18]). Außerdem ist auch das abnorme Lp-X (Seidel und Mitarbeiter[35]) in den entsprechenden Fraktionen nachweisbar.

Nach der Substitution hat sich dieses Spektrum in zweierlei Hinsicht verändert (Abbildung 18).

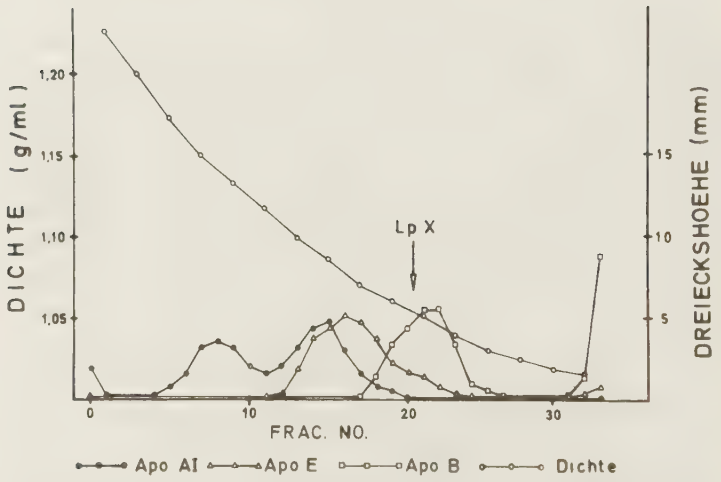


Abbildung 17: Apolipoproteinverteilung im LCAT-defizienten Serum nach Dichtegradientenultrazentrifugation

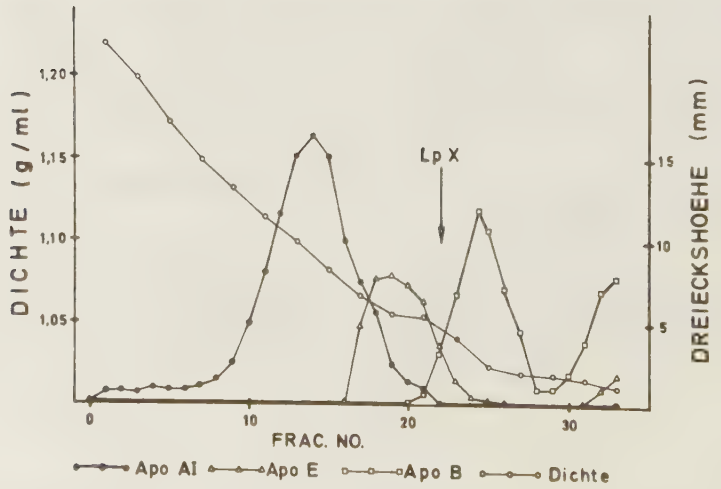


Abbildung 18: Apolipoproteinverteilung nach in vitro Substitution des LCAT-defizienten Serums nach Dichtegradientenultrazentrifugation

1. bildet das Apolipoprotein A-I nur einen Peak, jedoch mit geringerer Dichte als im Normalserum. 2. besitzt der Apolipoprotein-B-Peak eine geringere Dichte als vorher und unterscheidet sich damit vom normalen Apolipoprotein-B-Peak. Dagegen zeigt sich keine Veränderung des Lp-E oder Lp-X.

Der Cholesterinesteranstieg in den einzelnen Fraktionen ist sehr unterschiedlich. Vor der Substitution findet man das veresterte Cholesterin nur in den Lipoproteinen mit sehr geringer Dichte (VLDL). Aus der Zugabe von LCAT resultiert eine Vermehrung des Cholesterinesters in der HDL, der LDL und der VLDL. Dagegen zeigt die Lp-E-Fraktion nur minimale Veränderungen (Tabelle 4).

Tabelle 4: Anteil des Cholesterinesters vom Gesamtcholesterin in % in den Lipoproteinfraktionen

LCAT-defizientes Serum v. Substitution	Lipoproteinfraktionen				
	HDL_3	HDL_2	Lp-E	LDL	VLDL
% CE	0	0	1	1	15
LCAT-defizientes Serum nach Substitution	HDL		Lp-E	LDL	VLDL
% CE	51		1	42	53
normales Serum	HDL		LDL		VLDL
% CE	82		72		58

Die Apolipoproteinanalyse in einem diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Elektrophoresesystem nach NEVILLE[36] ermöglicht die Identifizierung der Apolipoproteine in den einzelnen Lipoproteinfraktionen vor und nach Substitution (Abbildung 19).

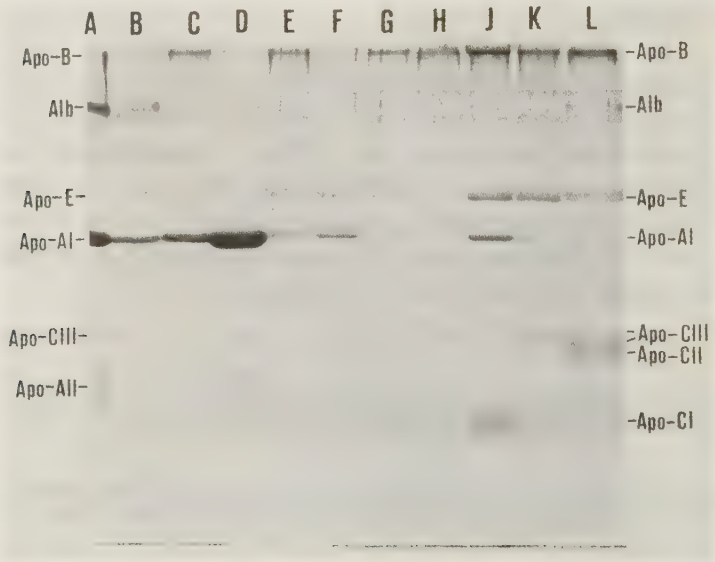


Abbildung 19: SDS Polyacrylamidelektrophorese der Lipoproteinfraktionen nach Neville. (A) normale HDL; (B) HDL_3 aus LCAT-defizientem Serum; (C) HDL_2 aus LCAT-defizientem Serum; (D) HDL nach Substitution; (E) Lp-E aus LCAT-defizientem Serum; (F) Lp-E nach Substitution; (G) LDL aus LCAT-defizientem Serum; (H) LDL nach Substitution; (J) VLDL aus LCAT-defizientem Serum; (K) VLDL nach Substitution und (L) normale VLDL

Die Lipoproteine mit hoher Dichte (HDL) enthalten vor allem Apolipoprotein A-I und daneben in unterschiedlicher Zusammensetzung Apolipoprotein E, A-II und C. Die Lipoprotein-E-Fraktionen haben sich nicht wesentlich verändert und enthalten ungefähr gleiche Mengen Apolipoprotein A-I und E sowie Apolipoprotein C. Die LDL- und VLDL-Fraktionen setzen sich in ihrem Apolipoproteinanteil aus Apolipoprotein B, E und A-I, sowie aus unterschiedlichen Mengen der Apolipoproteine C-I, C-II und C-III zusammen. Dabei wurde Apo C-I in die HDL transferiert und Apo C-III und C-II aus der HDL aufgenommen.

Die morphologischen Studien der Lipoproteinfraktionen mit Hilfe der Elektronenmikroskopie zeigen die strukturellen Veränderungen vor und nach der Substitution. Auf Zugabe von LCAT ist das Verschwinden der geldrollenartig angeordneten Scheiben in der HDL_2-Fraktion vor Substitution am auffälligsten (Abbildung 20). Die Lp-E-Fraktionen zeigen sich nur wenig verändert (Abbildung 21). Die LDL besteht nach Substitution aus homogenen Partikeln, die vorher mit Lipoproteinen aus der benachbarten Lp-E-Fraktion verunreinigt waren (Abbildung 21).

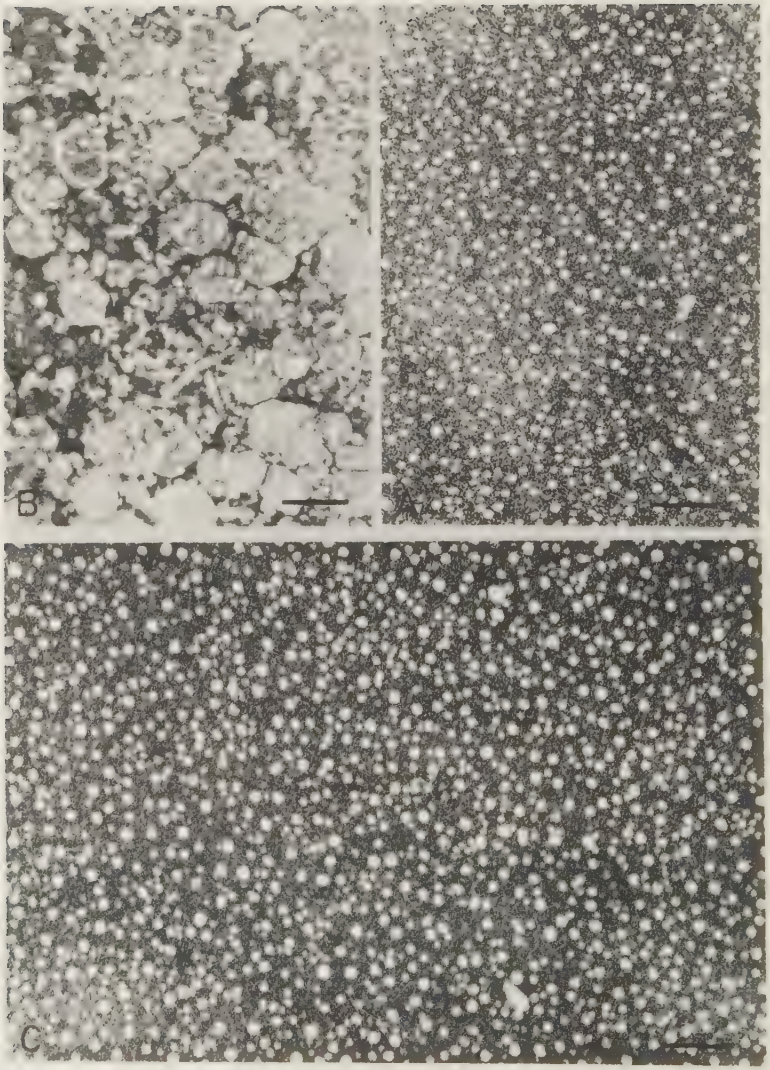


Abbildung 20: Elektronenoptische Aufnahmen der (A) HDL_3 aus LCAT-defizientem Serum; (B) HDL_2 aus LCAT-defizientem Serum und (C) HDL^2 nach Substitution. Der Balken repräsentiert 1000 Å

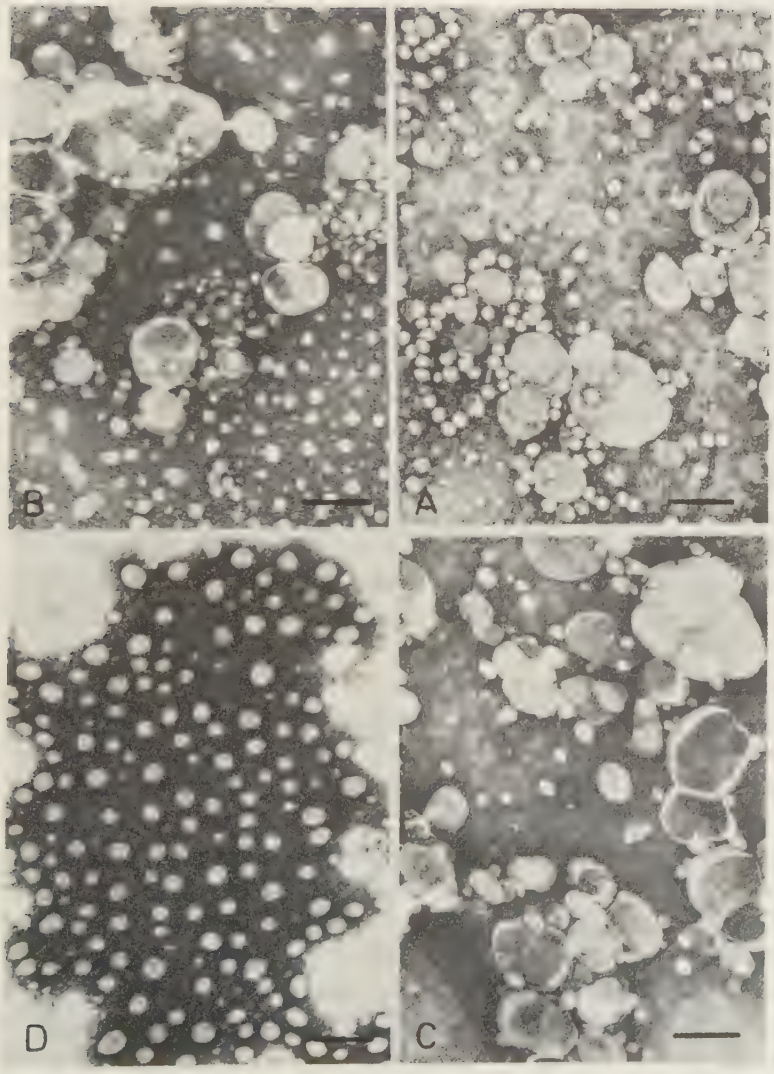


Abbildung 21: Elektronenoptische Aufnahmen von (A) Lp-E aus LCAT-defizientem Serum; (B) Lp-E nach Substitution; (C) LDL aus LCAT-defizientem Serum und von (D) LDL nach Substitution. Der Balken repräsentiert 1000 Å.

7. Diskussion

Nachdem ich 1974 mit den Versuchen zur Reinigung der LCAT begonnen hatte, sind zwei Publikationen erschienen, die sich mit demselben Thema befassen (ALBERS und Mitarbeiter[37] 1976 und VARMA und SOLOFF[38] 1976). Beide Arbeitskreise kommen jedoch zu unterschiedlichen Ergebnissen. Albers und Mitarbeiter bestimmten ein Molekulargewicht von 68000, das mit dem von mir gefundenen übereinstimmt. Auch die Aminosäureanalyse führte zu annähernd ähnlichen Ergebnissen. Die Reinigungsmethode dieser Autoren ist jedoch komplizierter und umfaßt zusätzliche Affinitätschromatographie.

Die Präparation von Varma und Soloff zeigt andere Eigenschaften und ist auch in der Diskelektrophorese nicht einheitlich. Beide Arbeitskreise verwenden ähnliche Reinigungsmethoden wie ich, die Unterschiede liegen jedoch in einigen wichtigen Details.

Die Zugabe von Natriumtaurocholat zum zweiten Ultrazentrifugationsschritt ist dabei der wesentliche Unterschied meiner Methode gegenüber der ihrigen. Dadurch wird eine Trennung des Komplexes VHDL und LCAT erreicht (Akanuma und Glomset[22] 1968). Die weitere Anwesenheit dieses Detergenz bei der Hydroxylapatitaffinitätschromatographie ergibt ein fast sauberes Enzym, während die Verunreinigungen bei der niedrigen Ionenstärke absorbiert werden. Die Abtrennung von Apo D gelingt am besten an einer Sepharosesäule, die kovalent gebundenes Anti-Apo D enthält. Eine andere Möglichkeit ist die präparative Diskelektrophorese in Gegenwart von Natriumtaurocholat, die jedoch sehr schlechte Ausbeuten ergibt. Bei den analytischen Methoden bietet dieses Verfahren die einfachste Art, die Reinheit des Enzyms zu testen.

Die Aufspaltung des reinen Enzyms in drei aktive Hauptbanden in der isoelektrischen Fokussierung läßt vermuten, daß die Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase in Form von Isoenzymen vorliegt, oder daß das Enzym chemisch modifiziert ist. Voruntersuchungen, die auch eine präparative isoelektrische Fokussierung einschlossen, zeigten, daß das Enzym mit bestimmten sauren Ampholinen Komplexe bildet, die zu einer scheinbaren Veränderung des isoelektrischen Punktes führen.

Das Antiserum gegen die LCAT ist in der Lage, diese vollständig zu inhibieren. VARMA und Mitarbeiter[39] berichteten, daß ihr Anti-LCAT-Serum die LCAT zu 70 % inaktivieren kann. Da sie jedoch die Anwesenheit von Antikörpern gegen Anti-Apo D nicht ausgeschlossen haben, ist es möglich, daß die Inhibition, die sie beschreiben, auf unspezifische Reaktionen zurückgeht. Die Autoren zeigen diese Inaktivierung im kompletten Humanserum und in diesem Fall erreichen auch andere Antiseren eine teilweise Inhibition (Abbildung 12).

Die Aktivitätsbestimmung nach Glomset und Wright[25] oder nach Stokke und Norum[24] stellen nicht die initiale in vivo Aktivität der LCAT dar, da im Serum das Cholesterin bereits zu 60 - 70 % verestert ist und beide Testverfahren die Enzymaktivität erst von diesem Stadium an messen. Die Änderung der Reaktionsgeschwindigkeit nach der Zunahme der Veresterungsrate von 5 % wurde auch von Stokke und Norum[24] sowie von KATTERMANN und WOLFRUM[40] beschrieben. Danach wird die Geschwindigkeit reduziert, da wahrscheinlich das Cholesterin der HDL weitgehend aufgebraucht ist und aus anderen Lipoproteinklassen Cholesterin in die HDL transferiert wird. Dieser Austausch geht langsam vor sich, daher kommt es zu einer Verringerung der Reaktionsgeschwindigkeit.

Im Gegensatz zu den Befunden bei den Patienten aus Norwegen (GJONE und Mitarbeiter[41] 1974) ist es möglich, die heterozygoten Familienmitglieder aus Sardinien zu erkennen. Dieses könnte ein Hinweis auf unterschiedliche genetische Grundlagen der LCAT-Defizienz in den verschiedenen Familien sein, da für die Enzymbestimmung die gleichen Testverfahren angewendet wurden.

Die in vitro Substitution des LCAT-defizienten Serums zeigt, daß es möglich ist, den Cholesterinesteranteil drastisch durch eine einfache Inkubation mit sauberer LCAT zu erhöhen. Dabei ergeben sich Veränderungen in fast allen Lipoproteinfraktionen, die jedoch nicht zu einer Normalisierung führen. Die abnormen Lipoproteine Lp-E und Lp-X besitzen nach der Substitution eine etwas geringere Dichte bei einer annähernd gleichen Apolipoproteinzusammensetzung und einem unveränderten Cholesterin-Cholesterinester-Verhältnis. Dieses spricht nicht für eine direkte Rolle dieser Lipoproteine bei dem Lipidmetabolismus, der in Zusammenhang mit der LCAT-Reaktion steht und läßt vermuten, daß es sich bei den beiden abnormen Lipoproteinen um " artifizielle " Produkte handelt.

Von NORUM und Mitarbeitern[42] 1976 wurden in vitro Substitutionen bei norwegischen Patienten durchgeführt. Dabei erhielten sie teilweise sehr ähnliche Ergebnisse, wie die hier beschriebenen, obwohl sie eine grob gereinigte LCAT-Präparation verwandten, die zudem nicht charakterisiert war, außerdem den Cholesterinanteil nicht so sehr erhöhten und andere Untersuchungsmethoden benutzten.

In einem wesentlichen Punkt unterscheiden sich jedoch die Befunde, da diese Autoren einen Transfer des Apo-

lipoproteins E von der HDL zur VLDL beschrieben, der durch die hier vorliegenden Ergebnisse nicht bestätigt wurde. Norum und Mitarbeiter[42] nahmen an, daß das Apo E als Transportprotein für den entstandenen Cholesterinester diente. Da in ihrem Diskeletrophoresesystem der Bereich, in dem das Apo E wandert, im Gegensatz zu der hier gezeigten SDS-Gelelektrophorese nach Neville sehr wenig differenziert, haben sie den Apo E-Gehalt der VLDL nach Substitution möglicherweise zu hoch bestimmt.

Die Untersuchungen von Hamilton und Mitarbeitern[20] an der perfundierten Rattenleber, die eine direkte Beteiligung des Apolipoproteins E bei der Veresterung des Cholesterins vermuten lassen, scheinen auf den Menschen nicht ohne weiteres übertragbar zu sein.

Das Lipoprotein X stellt kein Substrat für die LCAT-Reaktion dar. Die Ergebnisse von PATSCH und Mitarbeitern[43] die isoliertes Lp-X mit teilweise gereinigter LCAT inkubierten, zeigten nur einen sehr minimalen Anstieg des Cholesterinesters ohne eine Veränderung des Lipoproteins X. Die mögliche extrem geringe Zunahme des Cholesterinesters in diesem lipoprotein bei der hier beschriebenen in vitro Substitution sind gegenüber den anderen Veränderungen unwesentlich.

Dagegen scheinen die HDL_3- und HDL_2-Partikel des LCAT-defizienten Serums eine Art "Precursor" für die normale HDL darzustellen, da bei der Substitution eine neue HDL-Fraktion aus beiden Fraktionen gebildet wird. Die Rolle, die LDL und VLDL dabei spielen, scheint nur im Austausch von Cholesterin bzw. Cholesterinester mit der HDL zu bestehen.

Inwieweit diese Versuche für die in vivo Verhältnisse verbindlich sind, kann man erst sagen, wenn man eine in vivo Substitution durchgeführt hat, die im Augenblick an der geringen zur Verfügung stehenden Menge LCAT scheitert.

8. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschreibt eine einfache Methode zur Reinigung der Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase aus menschlichem Plasma durch eine Kombination von Ammoniumsulfatfällung, Ultrazentrifugation, Hydroxylapatitchromatographie und Immunabsorption.

Die Ausbeute beträgt dabei 20 % und die Präparation ist 15000-fach angereichert. Das aktive Enzym zeigt eine Bande in verschiedenen Polyacrylamidgelelektrophoresesystemen. Das Molekulargewicht beträgt 67000 $\pm$ 2000 und wurde mittels Elektrophorese in Natriumdodecylsulfat und Gelchromatographie bestimmt. Die Aminosäurezusammensetzung unterscheidet sich von allen bekannten Apolipoproteinen. Bei der isoelektrischen Fokussierung wird das Enzym in drei aktive Hauptbanden getrennt. Der isoelektrische Punkt dieser Isoenzyme beträgt pH 4,28 , 4,33 und 4,37.

Immunologisch ist die Präparation frei von Apolipoproteinen A-I, A-II, B, C, D und E sowie von Humanserumalbumin. Sie bildet jedoch einen Präzipitationsbogen im Ouchterlony-Test mit einem Antiserum, das gegen das gereinigte Enzym hergestellt wurde. Dieses Antiserum inhibiert spezifisch die Aktivität des Enzyms und der LCAT im Gesamtserum.

Mit Hilfe dieses Antiserums ist es möglich, die Abwesenheit des LCAT-Proteins im Serum eines Patienten mit familiärer LCAT-Defizienz nachzuweisen.

Die Heterozygoten für die LCAT-Defizienz in der M.-Familie aus Sardinien zeigen eine um die Hälfte verringerte LCAT-Aktivität. Die Krankheit wird nach den hier vorliegenden Daten in einem autosomal rezessiven Erbgang vererbt.

Es ist möglich,durch die in vitro Substitution mit sauberer LCAT im Serum eines Patienten mit familiärer LCAT-Defizienz den Cholesterinesteranteil in einem großen Ausmaß zu erhöhen. Dieses spricht, wie die Abwesenheit des LCAT-Proteins, nicht für einen Cofaktormangel bei dieser Krankheit. Die Veränderungen, die sich nach der Substitution zeigen,lassen eine große Komplexität aller Vorgänge vermuten,die nötig wären,um eine volständige Normalisierung zu erreichen.

Experimenteller Teil

1. Aktivitätsbestimmung der LCAT

Die Messung der Enzymaktivität in einer Probe beruht auf der Ermittlung der Menge an ^{14}C-Cholesterinester, die sich aus ^{14}C-Cholesterin durch Inkubation mit der Probe bildet. Als Substrat dient ein Gemisch aus inaktiviertem Humanserum und ^{14}C-Cholesterin in Humanalbuminlösung. Für das Humanserum wurden gleiche Mengen Serum von 24 gesunden Blutspendern gepoolt und mit der gleichen Menge 0,9 % NaCl, die mit 0,05 % ÄDTA-NaOH (pH 7,0) gepuffert war, eine halbe Stunde auf 56° C erhitzt. Dieser Pool wurde zu jeweils 5 ml-Portionen eingefroren (- 20° C) und bei Bedarf wieder aufgetaut. Das ^{14}C-Cholesterin (Amersham-Buchler, Braunschweig; spezifische Aktivität 50 m Ci/ mmol) wurde in 15 ml Äthanol gelöst. Davon wurden 1,5 ml zu 13,5 ml einer 5 %-igen Humanalbuminlösung gegeben und diese Lösung 8 Stunden mit Stickstoff durchperlt, um das Äthanol zu entfernen. Auch dieses Präparat wurde bei -20° C gelagert.

Zur LCAT-Bestimmung wurden 350 µl inaktiviertes Humanserum und 100 µl ^{14}C-Cholesterin in Humanalbuminlösung gemischt. Dazu kamen die Probenlösungen und 5 µl 0,4 M ß-Mercaptoäthanol. Diese Mischung wurde im allgemeinen für 6 Stunden bei 37° C inkubiert. Um die Enzymaktivität in den Gelsegmenten von der Diskelektrophorese oder der isoelektrischen Fokussierung zu messen, wurde die Inkubationsdauer bis zu 24 Stunden erweitert.

Im Anschluß daran wurden die Proben sofort eingefroren und gefriergetrocknet. Zu dem Lyophilisat wurden 500 µl Methanol: Chloroform 1 : 2 und 40 µl H_2O gegeben, um die Lipide zu extrahieren. Danach wurden die Proben geschüttelt (ungefähr 20 min) und abzentrifugiert. Das Protein schwamm dabei auf der Oberfläche der organischen Phase, die die Lipide enthielt.

Die wäßrige Phase mit dem Protein wurde nochmals mit 250 µl Methanol: Chloroform 1 : 2 gewaschen und die vereinigten lipidhaltigen Phasen bei 56° C eingedampft.

Der Rückstand wurde in 40 µl Methanol: Chloroform 1 : 2 aufgenommen und auf eine Silicageldünnschichtplatte (Polygram Sil G, Macherey und Nagel, Düren) aufgetragen. Der Auftragungsbereich sollte ungefähr 2 cm breit sein. Links und rechts auf die Platte kam ein Gemisch von reinem Cholesterin und Cholesterinester als Referenz. Die Menge sollte so groß sein, daß man beide Flecke nach der Chromatographie als dunkle Punkte im Durchlicht sieht. Als Chromatographiemittel wurde Petroleumbenzin (Siedepunktsbereich 40 - 60° C) : Diäthyläther: Essigsäure im Verhältnis 76 : 20 : 1 verwendet.

Sobald die gelb gefärbten Cholesterin- und Cholesterinesterbanden ungefähr 8 cm voneinander getrennt waren, konnte man die Platte aus dem Chromatographietank nehmen und mit Hilfe der Referenzen die Lage des Cholesterins und des Cholesterinesters festlegen. Die Dünnschichtplatte, die auf eine Plastikfolie aufgezogen ist, wurde zerschnitten und jeweils die beiden Banden und ein Blindwert in die entsprechenden Zählröhrchen gesteckt. Dazu wurden 20 ml Scintillationsflüssigkeit gegeben, die aus 4 g 2,5-Diphenyloxazol und 0,1 g 2,2'-p-Phenylenbis (4-methyl-5 phenyloxazol) bestand und die in einem Liter Toluol gelöst wurden.

Die Radioaktivität wurde in einem Flüssigkeitsscintillationszähler BF 5000 der Firma Berthold und Frieseke jeweils 10 Minuten lang gezählt. Eine Quenchkorrektur war nicht notwendig.

Die Berechnung der Veresterungsrate V wurde folgendermaßen durchgeführt:

$$V = \frac{\text{cpm (Cholesterinesterbande)} - \text{cpm (Blindwert)}}{\text{cpm (Cholesterinbande)} - 2 \times \text{cpm (Blindwert)}}$$

Damit läßt sich ausrechnen, wieviel mU in einem ml Probe enthalten sind.

$$\text{mU/ ml} = V \times F \times \left(\begin{array}{l} \mu\text{g Cholesterin des Humanserumpools} \\ + \mu\text{g Cholesterin der Probe} \end{array} \right)$$

Der Faktor F beträgt 0,144 $ml^{-1} \times min^{-1}$ und ergibt sich aus der Umrechnung des Probenvolumens, des Molekulargewichtes und der Zeit.

2. Isolierungsmethode für die LCAT

Das eingefrorene menschliche Plasma (600 - 800 ml) wurde über Nacht bei 4° C aufgetaut und der Niederschlag in einem JA-14 Rotor in einer J-21 B-Kühlzentrifuge der Firma Beckman (Paolo Alto USA) bei 14000 Umdrehungen pro Minute abzentrifugiert.

Zu dem Überstand wurden 19,4 g festes Ammoniumsulfat pro 100 ml gegeben, um eine 35 %-ige Sättigung zu erreichen. Diese Lösung wurde 1/2 Stunde bei 4° C gerührt und anschließend 1/2 Stunde bei 0° C und 14000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Rotor und Zentrifuge für die Ammoniumsulfatfällung waren dieselben wie oben beschrieben. Der resultierende Niederschlag wurde verworfen,und der Überstand wurde durch Hinzufügung von 18,4 g Ammoniumsulfat pro 100 ml Überstand zu 65 % mit Ammoniumsulfat gesättigt. Nach 1/2 Stunde Rühren bei 4° C wurde die Lösung wieder abzentrifugiert wie vorher beschrieben. Der Überstand wurde abgegossen, der Niederschlag direkt in einen Dialyseschlauch transferiert und gegen 5 Liter 5,0 mM ÄDTA-NaOH pH 7,0 und 0,05 M ß-Mercaptoäthanol 16 Stunden dialysiert.

Das Dialysat wurde mit 0,325 g festem KBr pro ml auf eine Salzdichte von d = 1,21 g/ ml eingestellt und mit der entsprechenden Salzlösung auf ein Volumen von 210 ml aufgefüllt. Dithioerythritol (DTE) in einer Endkonzentration von 1,0 mM wurde dazugegeben und diese Lösung 30 Stunden bei 5° C in einem TI-60 Rotor und einer L-5-65 Ultrazentrifuge (Beckman Instrument) bei einer Umdrehung von 59000 U/ min zentrifugiert.

Von jedem Zentrifugenröhrchen wurden die oberen 15 ml ohne die pelletierten Lipoproteine mit einer Spritze abgenommen. Das Flotat wurde mit der Salzlösung (d = 1,21 g/ ml) auf 140 ml aufgefüllt, Natriumtaurocholat und DTE in einer Endkonzentration von 1,5 mM bzw. 1,0 mM hinzugefügt und ultrazentrifugiert. Das bei der ersten Ultrazentrifugation anwesende DTE wird sehr leicht durch Sauerstoff oxidiert und wurde deshalb immer wieder neu zu der Enzympräparationslösung gegeben.

Die zweite Ultrazentrifugation dauerte 20 Stunden bei den gleichen Bedingungen wie bei der ersten. Danach wurden die unteren 30 ml jedes Zentrifugenröhrchens abgesaugt und dialysiert. Der Dialysepuffer bestand aus 1,0 mM Natriumphosphatpuffer pH 6,8; 1,0 mM DTE und 0,5 mM Natriumtaurocholat. Die Dialyse dauerte 40 Stunden mit zweimaligem Wechsel des Dialysepuffers. Dieser und alle folgenden Schritte wurden bei 4° C durchgeführt.

Nach der Dialyse wurde die Enzymlösung ultrafiltriert in einer Modell 52-Zelle und einer PM-30 Membran (Amicon, Witten/ Ruhr). Das Volumen wurde auf ungefähr 10 ml reduziert und auf eine Hydroxylapatitsäule (Ø 2,6 cm x 24 cm) , die mit dem Dialysepuffer equilibriert war, aufgetragen. Das Enzym wurde mit einem 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 6,8; 1,0 mM DTE und 0,5 mM Natriumtaurocholat von der Säule eluiert. Die anderen Proteine wurden mit 0,65 M Kaliumphosphatpuffer pH 6,8 anschließend von der Säule entfernt. Die Elutionsgeschwindigkeit betrug 30 - 60 ml pro Stunde.

Der erste Peak wurde wiederum ultrafiltriert bis zu einem Volumen von 10 ml. Dazu kamen 10 ml 0,05 M Tris-HCl pH 7,4; 0,1 M NaCl; 0,5 mM Natriumtaurocholat und 2,0 mM 5,5'- Dithiobisnitrobenzoesäure (DTNB). Die Enzymlösung wurde wieder ultrafiltriert und dreimal mit demselben Puffer ohne DTNB gewaschen. Das Endvolumen sollte 2 ml nicht übersteigen.

Anschließend wurde diese Menge auf eine Anti-Apo D - Sepharosesäule (Ø 1 cm x 15 cm) gegeben und das saubere Enzym mit Tris-NaCl-Puffer und Natriumtaurocholat eluiert. Das gebundene Apo D wurde mit 0,2 M Glycin-HCl pH 2,1 und 4 M Harnstoff abgespalten und die Sepharosesäule mit 0,85 % NaCl, 0,05 % ÄDTA-NaOH pH 7,0, Merthiolat und NaN_3 gewaschen.

3. Polyacrylamidgelelektrophorese

3.1. Diskontinuierliches System nach Ornstein[28] und Davis[29] mit Natriumtaurocholat

Die Gele bestehen aus zwei übereinander polymerisierten Abschnitten, die sich in ihrem pH-Wert und ihrer Porengröße unterscheiden. Das obere Gel dient zur Konzentrierung der Proben, die im unteren Gel aufgetrennt werden. Zur Gelherstellung braucht man sechs verschiedene Lösungen.

Gellösungen:

Lösung A: 18,15 g Tris
24,0 ml 1 N HCl
0,23 ml Tetramethyläthylendiamin
9 mg Natriumsulfit
auf 50 ml mit Wasser auffüllen (pH 8,9)

Lösung B: 2,85 g Tris
x ml 1 N H_3PO_4 bis pH 6,9
auf 50 ml mit Wasser auffüllen

Lösung C: 15 g Acrylamid
0,4 g N,N'-Methylenbisacrylamid
auf 50 ml mit Wasser auffüllen

Lösung D: 5 g Acrylamid
1,25 g N,N'-Methylenbisacrylamid
auf 50 ml mit Wasser auffüllen

Lösung E: 4 mg Riboflavin in 100 ml Wasser

Lösung F: 70 mg Ammoniumperoxodisulfat in 100 ml Wasser

Die Gele wurden in einseitig mit Parafilm verschlossenen Röhrchen (Ø 0,5 cm) polymerisiert.
Das Untergel setzte sich zusammen aus:

1 Teil Lösung A
2 Teile Lösung C
1 Teil Lösung E
4 Teile Lösung F

Dazu kam Natriumtaurocholat in einer Endkonzentration von 0,5 mM im Gel. Dieses Gemisch wurde nach dem Entgasen bis zu einer Höhe von 5,5 cm in die Röhrchen eingefüllt. Nach dem Überschichten mit Wasser ließ man die Gele vor einer Tageslichtfluoreszenzlampe polymerisieren.
Danach wurde das überschüssige Wasser entfernt und die Obergellösung nach dem Entgasen aufgegeben. Diese setzte sich zusammen aus:

1 Teil Lösung B
2 Teile Lösung D
1 Teil Lösung E
4 Teile Lösung F

Wiederum war Natriumtaurocholat in einer Endkonzentration von 0,5 mM anwesend. Die Gele wurden wieder mit Wasser überschichtet und vor der Lampe polymerisiert. Die fertigen Gele sollten über Nacht im Kühlschrank aufgehoben werden, da sich dabei die Trennleistung verbessert.

Für die Elektrophorese wurden die Proben mit Glyzerin und einer 5 %-igen Bromphenolblaulösung versetzt, auf die Gele gegeben und mit dem oberen Elektrophoresepuffer überschichtet. Als Elektrophoresegerät wurde die Elektrophoresekammer der Firma Shandon verwendet. Das Gleichspannungsgerät stammte von derselben Firma. Der Elektrophoresepuffer war ein verdünnter Glycin-Tris-Puffer.

Elektrophoresepuffer: 28,8 g Glycin
6,0 g Tris

auf 1 l mit Wasser auffüllen
(pH 8,3)

Für die Elektrophorese wurde dieser 1 : 10 verdünnt. Der obere Elektrophoresepuffer enthielt zusätzlich 0,5 mM Natriumtaurocholat. Die Elektrophoresekammer war so gepolt, daß die Kathode oben war. Die Stromstärke betrug am Anfang 1,25 mA pro Röhrchen, bis die Bromphenolblaufront das Obergel passiert hatte. Danach wurde die Stromstärke auf 2,5 mA erhöht. Die Spannung sollte jedoch nicht 150 V überschreiten. Die Elektrophorese wurde im Kühlraum bei 4° C durchgeführt und wurde beendet, wenn die Bromphenolblaubande gerade unten aus dem Röhrchen austrat. Die Gele wurden mit Hilfe einer wassergefüllten Spritze aus dem Röhrchen entfernt und sofort in 0,1 %-iger Comassiefärbelösung gefärbt.

3.2. Isoelektrische Flachgelfokussierung

Die Fokussierung wurde in dem Multiphorgerät der Firma LKB (Bromma, Schweden) durchgeführt. Das Gel wurde zwischen zwei Glasplatten polymerisiert, wobei ein Siliconstreifen von 1 mm Dicke die Kammer für die Aufnahme der Gellösung schaffte. Diese bestand aus :

0,75 g	Acrylamid
0,02 g	N,N'- Methylenbisacrylamid
100 µl	Ammoniumperoxodisulfatlösung (70 mg/ml)
10 µl	5 %-iges Tetramethyläthylendiamin
0,5 ml	Ampholine (LKB) pH 3,5 - 5,0
auf 10 ml mit Wasser auffüllen	

Nach dem Polymerisieren wurden eine Glasplatte und der Siliconstreifen entfernt und das Flachgel auf die Kühlplatte des Multiphorgerätes gelegt. Je ein mit Elektrodenpuffer getränkter dicker Filterpapierstreifen wurde auf die Längsseiten des Gels gelegt und die Platinelektroden daraufgedrückt.

An der Kathode wurde der Papierstreifen mit 2,5 %-iger Äthylendiaminlösung benetzt und an der Anode mit 1,5 %-iger Phosphorsäure. Die Regulierung der Stromstärke und der Spannung erfolgte so, daß die Leistung niemals 8 Watt überschritt. Alle 10 Minuten wurde die Spannung erhöht, da mit der Bildung des pH-Gradienten der Widerstand sich erhöhte. Sobald eine Spannung von 800 V erreicht war, und die Stromstärke eine Viertelstunde konstant geblieben war, wurden die Proben mit Hilfe von 5 x 5 mm großen Papierstreifen aufgetragen und eine Spannung von 800 V für 2 Stunden angelegt.

Zur Proteinfärbung wurde das Flachgel danach für eine Stunde in 5 %-iger Trichloressigsäure; 5 %-iger Sulfosalizylsäure gewaschen, um die Proteine zu fixieren und die Ampholine zu entfernen, da diese sich auch mit Comassie anfärben lassen. Das Gel wurde danach in 0,1 %-iger Comassielösung gefärbt. Zur pH-Bestimmung wurde das Gel parallel zu den Elektroden in ungefähr 2 mm breite Streifen zerschnitten, in 0,9 %-ige ungepufferte NaCl-Lösung gegeben und darin nach 2 Stunden der pH mit einer Glaselektrode gemessen.

3.3. Geleletrophorese in SDS nach Weber und Osborn[31]

Diese Elektrophorese ermöglicht eine Trennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht, wenn sie alle gleichviel SDS aufnehmen. Ich habe ein 6 %-iges Gelsystem verwendet, da dann die LCAT so schnell wandert, daß ihr Molekulargewicht gut bestimmt werden kann. Es wurden für die Gelzubereitung 3 Lösungen gebraucht.

Gelpuffer: 7,8 g $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$
24,3 g $Na_2HPO_4 \cdot 2\ H_2O$
2 g SDS
auf 1 l mit Wasser auffüllen

Monomerlösung: 13,3 g Acrylamid
0,36 g N,N'-Methylenbisacrylamid
auf 100 ml mit Wasser auffüllen

Persulfatlösung: 15 mg/ ml Ammoniumperoxodisulfat

Diese wurden folgendermaßen gemischt:

15 ml Gelpuffer
13,5 ml Monomerlösung
1,5 ml Persulfatlösung
45 µl Tetramethyläthylendiamin

Die Gellösung wurde entgast und in Röhrchen (Ø 0,5 cm) bis zur Höhe von 6,0 cm gefüllt und mit Wasser überschichtet.

Die Proben für die Elektrophorese sollten nicht mehr Salz enthalten, als einer physiologischen Kochsalzlösung entspricht. Die Probenlösung wurde auf einen SDS-Gehalt von 1 - 2 % eingestellt, 10 µl ß-Mercaptoäthanol hinzugefügt und alles 5 Minuten gekocht. Das Probenvolumen sollte nicht 100 µl übersteigen. Die aufzutragende Probe wurde mit Glyzerin und Bromphenolblau versetzt und auf das Gel aufgetragen. Die benutzten Geräte sind dieselben, wie für die diskontinuierliche Elektrophorese.

Der Elektrophoresepuffer wurde durch Verdünnen des Gelpuffers im Verhältnis 1 : 1 mit Wasser hergestellt. Die Stromstärke betrug 5 mA pro Röhrchen,und die Elektrophorese dauerte ungefähr 6 - 8 Stunden. Danach wurden die Gele sofort in 0,25 %-iger Comassielösung gefärbt.

Will man die relative Wanderungsstrecke der Proteine für die Molekulargewichtsbestimmung berechnen, muß man vorher die Länge der Gele und die zurückgelegte Strecke der Bromphenolblaubande messen, außerdem die Länge des Gels nach dem Färben und Entfärben und die Position der Proteinbanden.

Die Gleichung

$$\frac{\text{Proteinbande (cm) x Gellänge vorher (cm)}}{\text{Bromphenolblaubande (cm)x Gellänge nachher (cm)}}$$

ergibt die relative Wanderungsgeschwindigkeit des Proteins, die proportional zum Logarithmus des Molekulargewichtes ist. Mit Hilfe von Eichproteinen kann man das Molekulargewicht des gesuchten Proteins bestimmen.

3.4. Diskontinuierliches SDS-Gelelektrophorese-system nach Neville[36]

Diese Elektrophorese erlaubt eine schnellere Trennung der Proteine nach dem Molekulargewicht, als es das System nach Weber und Osborn erlaubt. Außerdem spielt auch die Ladung des Proteins eine Rolle, so daß gleichgroße Proteine mit unterschiedlicher Ladung geringfügig getrennt werden. Die Elektrophorese wurde in einem Flachgelelektrophoresegerät Typ Havanna der Firma Desaga durchgeführt. Für die Zubereitung der Gele benötigte man folgende Lösungen:

Untergelpuffer: 12,3 ml 1 N HCl
20,68 g Tris
aus 100 ml mit Wasser auffüllen pH 9,18

Obergelpuffer: 10,68 ml 1 N H_2SO_4
2,62 g Tris
auf 100 ml mit Wasser auffüllen pH 6,14

Untere Acrylamidlösung:
11,0 g Acrylamid
0,1 g N,N'-Methylenbisacrylamid
auf 25 ml mit Wasser auffüllen

Obere Acrylamidlösung:
3,0 g Acrylamid
0,2 g N,N'- Methylenbisacrylamid
auf 25 ml mit Wasser auffüllen

Catalysator AP:
50 mg Ammoniumperoxodisulfat in 25 ml Wasser

Catalysator T: 120 µl Tetramethyläthylendiamin in 20 ml H_2O

Das Untergel wurde hergestellt aus:

3,0 ml Untere Acrylamidlösung
3,o ml Untergelpuffer
3,0 ml Catalysator AP
3,0 ml Catalysator T

Diese Lösung wurde entgast, in die Gelkassette ungefähr 9 - 10 cm hoch eingefüllt und mit Isobutanol überschichtet. Nach der Polymerisation wurde die Oberfläche des Untergels mit 2,0 ml Obergellösung zur Entfernung des Isobutanols gewaschen. Die Obergellösung setzte sich zusammen aus:

2,5 ml Obere Acrylamidlösung
2,5 ml Obergelpuffer
4,0 ml Wasser
1,0 ml Catalysator AP

Nach der Abnahme von 2,0 ml zum Waschen des Untergels wurden 10 µl Tetramethyläthylendiamin zugegeben, die Lösung entgast und 2 cm hoch auf das Untergel gefüllt. Um die einzelnen Vertiefungen für die Proben zu erhalten, wurde von oben ein Plastikkamm in die Obergellösung eingetaucht und das Gel so polymerisiert.

Die Proben wurden genauso wie für die SDS-Elektrophorese nach Weber und Osborn vorbereitet, jedoch sollte das Volumen nicht 30 µl überschreiten. Die untere Elektrodenkammer wurde mit Unterpuffer gefüllt. Dieser setzte sich zusammen aus:

51,7 g Tris
15,37 ml 2 N HCl

auf 1 l mit Wasser auffüllen pH 9,5

Dann wurden die Gelplatten mit den aufgetragenen Proben in die untere Elektrodenkammer eingehängt, mit Oberpuffer überschichtet und die obere Elektrodenkammer mit diesem Puffer aufgefüllt.

Oberpuffer: 2,47 g Borsäure
4,92 g Tris
1,0 g SDS
auf 1 l mit Wasser auffüllen pH 8,64

Die Elektrophorese lief mit 15 mA pro Gelplatte.
Die Elektrophorese dauerte etwa 2 Stunden, bis das Bromphenolblau fast die untere Gelgrenze erreicht hatte. Danach wurde die Gelplatte aus der Kassette genommen und in 0,25 %-iger Comassielösung gefärbt.

3.5. Färben und Entfärben

Alle Polyacrylamidgele wurden mit Comassie brillant blue R-250 (Serva, Heidelberg) für Proteine gefärbt.
Es wurden zwei verschiedene Lösungen benutzt.

1.) 0,1 % Comassie
100 ml Essigsäure
450 ml Äthanol
450 ml Wasser

2.) 0,63 g Comassie ≙ 0,25 %
23 ml Essigsäure
114 ml Äthanol
114 ml Wasser

Alle Gele wurden mit derselben Lösung entfärbt.

Entfärbelösung: 100 ml Essigsäure
250 ml Äthanol
650 ml Wasser

Nach dem mehrmaligen Wechsel der Entfärbelösung waren die Gele nur noch schwach blau gefärbt, während die Proteinbanden deutlich zu sehen waren. Zum Aufbewahren wurden die Gele in 7,5 %-iger Essigsäure gelagert.

4. Immunologische Methoden

4.1. Herstellung der Antisera

Die für die Immunisierung benötigten Antigene, wurden in unserem Labor hergestellt. Dr. Münscher von den Behringwerken, Marburg, nahm die intravenöse und subkutane Injektion an Kaninchen vor und überließ uns nach abgeschlossener Immunisierung die rohen Antiseren.

4.2. Absorption und Inhibition

Um eine polyspezifisches Antiserum, das Antikörper gegen verschiedene Antigene enthält, nur noch für ein einziges spezifisch zu machen, müssen alle anderen Antikörper entfernt werden. Dazu wurde eine kleine Menge (etwa 50 µl) Antiserum mit steigenden Mengen Antigenen zwei Stunden bei 37°C inkubiert und danach bei 4°C über Nacht stehen gelassen. Die möglicherweise entstandenen Niederschläge wurden bei lo ooo x g abzentrifugiert und die Überstände im Ouchterlonytest geprüft.

Reagierten diese nur noch mit dem einen gewünschten Antigen und nicht mehr mit den anderen, so konnte man diesen Arbeitsgang in einem größeren Maßstab (jeweils etwa mit 1 ml) wiederholen, und man erhielt dann ein Antiserum,das nur noch Antikörper gegen ein einziges Antigen besaß.

Dasselbe Verfahren wurde auch für den Inhibitionstest des Anti-LCAT-Serums mit der LCAT angewandt. Der Überstand wurde dann für die Aktivitätsbestimmung im LCAT-Test verwendet. Das Anti-LCAT-Serum durfte keine Enzymaktivität enthalten, diese wurde vorher durch Hitze inaktiv gemacht (eine halbe Stunde bei 56°C).Der Inhibitionstest für die Abbildung 14 wurde nach folgendem Schema durchgeführt:

	Absorptionsstufen			
	1	2	3	4
Anti-LCAT-Serum	100 µl	100 µl	100 µl	50 µl
a) normales Humanserum	0	40 µl	100 µl	100 µl
b) LCAT-defizientes Serum	0	40 µl	100 µl	100 µl
+ 0,9 %-ige NaCl	100 µl	60 µl	0	50 µl

Nach der Inkubation und Zentrifugation wurde von jeder Absorptionsstufe diejenige Menge entnommen, deren Gehalt 10 µl bzw. 20 µl Anti-LCAT-Serum entsprach. Sie wurde mit jeweils 50 µl normalem Humanserum inkubiert, der Niederschlag abzentrifugiert und der Überstand auf LCAT-Aktivität überprüft. Die LCAT-Aktivität, die durch die steigenden Mengen an normalem Humanserum dazukam, wurde von dem gemessenen Wert subtrahiert.

4.3. Immundiffusion nach Ouchterlony

Die von Ouchterlony[28] entwickelte Methode erlaubt es, kleine Mengen von Antigen durch die entsprechenden Antikörper nachzuweisen. Dazu läßt man Antigen und Antikörper in einer Agaroseplatte bei 37° C aufeinander zu diffundieren. An der Stelle, an der sie aufeinandertreffen, bilden sie ein Präzipitat, das im Durchlicht erkannt werden kann. Wichtig ist, daß beide sich mengenmäßig entsprechen, da es sonst evtl. zur Auflösung des Präzipitats kommt.

Die Agaroseplatten wurden folgendermaßen hergestellt. 1 g Agarose (Behringwerke) wurde mit 50 ml Wasser und 50 ml Sörensengebrauchslösung im Wasserbad gekocht, bis die Agarose aufgelöst war. Von dieser Lösung wurden jeweils 3 ml vorsichtig auf ein Menzelglas (5 cm x 5 cm) gegeben. Die Platten können nach Erstarren der Agarose 4 - 5 Tage im Kühlschrank gelagert werden. Zum Auftragen der Antiseren oder Proben wurden Löcher in die Agaroseschicht gestanzt und diese mit den Lösungen gefüllt. Die Sörensengebrauchslösung wurde aus zwei Lösungen hergestellt.

Lösung A: 5,933 g $Na_2HPO_4 \cdot 2\ H_2O$
4,560 g $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$
auf 500 ml mit Wasser auffüllen

Lösung B: 32,4 g NaCl
0,2 g Merthiolat
auf 1,6 l mit Wasser auffüllen

Lösung A und Lösung B ergaben im Verhältnis 1 : 4 gemischt die Sörensengebrauchslösung, die bei 4° C aufbewahrt wird. Nach der Diffusion wurden die Platten mit physiologischer NaCl-Lösung gewaschen, um alle Proteine bis auf das Immunpräzipitat zu entfernen, und unter einem dünnen Filterpapier getrocknet. Danach wurden sie mit 0,25 %-iger Comassielösung gefärbt und anschließend mit Entfärbelösung entfärbt, wobei die Immunpräzipitate weiterhin sichtbar blieben.

4.4. Quantitative Elektroimmunodiffusion

Um zu ermitteln, wieviel von einem bestimmten Antigen in der Probe enthalten ist, wendet man die Elektroimmunodiffusion nach LAURELL[44] an. Dabei wird ein spezifisches Antiserum mit einer Agaroselösung gemischt, die dann auf eine Glasplatte aufgetragen wird. In diese Schicht werden Löcher gestanzt und die Proben eingefüllt. Legt man an diese Platte ein elektrisches Feld an, so wandert das Antigen in der Platte auf die Anode zu, während die Antikörper aufgrund des pH-Wertes in der Agaroseschicht immobil sind. Da ein Überschuß an Antigen das Immunpräzipitat immer wieder auflöst, ergibt sich nach einiger Zeit ein Präzipitat, das wie ein sehr spitzes Dreieck aussieht. Die Höhe dieses Dreiecks ist proportional der Menge Antigen in jedem Loch.

Die Laurellplatten wurden nach folgender Methode hergestellt. 1,2 g Agarose C (Pharmacia, Uppsala, Schweden) wurde in 100 ml Gelpuffer im Wasserbad aufgelöst. Dazu kamen 0,1 g Triton X-100 (Serva, Heidelberg). Nach dem Auflösen wurde die Agarose auf 60° C abgekühlt. Zu 15 ml dieser Lösung kam das vorgewärmte spezifische Antiserum. Die Menge an Antiserum, die optimal für die Bestimmung der Antigenkonzentration war, variierte zwischen den verschiedenen Antiseren und mußte vorher ermittelt werden.

Die Mischung von Agarose und Antiserum wurde auf eine Glasplatte (12 cm x 8 cm) gegeben und nach dem Erstarren für 1 - 2 Tage im Kühlschrank aufbewahrt. Auf der Längsseite der Platte wurden Löcher gestanzt und die Proben, die mit 2 %-iger Triton X-100-Lösung im Gelpuffer verdünnt wurden, eingefüllt. Die so vorbereiteten Platten wurden

auf den Kühlblock eines Multiphor-Gerätes (LKB) gelegt.

In die Elektrodentanks wurde der Gelpuffer eingefüllt, die Laurellplatten über ein mit Gelpuffer getränktes Schaumgummi mit den Elektroden verbunden und eine Spannung von 300 V angelegt. Nach etwa 6 Stunden sollten alle möglichen spitzen Dreiecke vollständig geschlossen sein. Nach der Elektrophorese wurden die Platten gewaschen, getrocknet und gefärbt wie die Ouchterlony-Platten. Der Gelpuffer war ein Barbitalpuffer pH 8,6 mit einer Ionenstärke von 0,02 µ. Dazu wurden verwandt:

20,6 g Natrium- 5,5'- Diäthylbarbitursäure
4,0 g 5,5'- Diäthylbarbitursäure

auf 5 l mit Wasser aufgefüllt und der pH auf 8,6 eingestellt

4.5. Herstellung der Anti-Apo-D-Sepharose

Die für die LCAT-Präparation benötigte Sepharose, die kovalent gebundene Antikörper gegen Apo D enthielt, wurde nach folgender Methode hergestellt.

Zuerst wurde reines Apo D nach McCONATHY und ALAUPOVIC[32] gewonnen. Das gefriergetrocknete Protein wurde in einem ml 0,1 M $NaHCO_3$ pH 8,3; 0,5 M NaCl-Lösung gelöst. Diese Menge wurde an CNBr-aktivierte Sepharose 4 B (Pharmacia) nach der Vorschrift der Firma Pharmacia gekoppelt. Die Apo-D-Sepharose wurde in eine kleine Glassäule mit Fritte gefüllt. Über dieses Gel wurden kleine Mengen

(ungefähr 1 ml) eines Anti-Apo-D-Serums bei Raumtemperatur gegeben. Das Gel wurde mit Sörensengebrauchslösung gewaschen und die gebundenen Antikörper mit 0,2 M Glycin-HCl pH 2,1 abgespalten und eluiert.

Die reinen Apo-D-Antikörper wurden dialysiert und gefriergetrocknet und an CNBr-Sepharose 4 B nach demselben Verfahren wie vorher das Apo D gekoppelt. Die Anti-Apo-D-Sepharose ist dann gebrauchsfertig und sollte bei 4° C in 0,85 % NaCl; 0,05 % ÄDTA-NaOH pH 7,0; Merthiolat und NaN_3-Lösung aufbewahrt werden.

5. Verschiedenes

5.1. Proteinbestimmung nach LOWRY[45]

Die Proteinbestimmung beruht auf einer Farbreaktion von Protein mit dem Folin Ciocalteus Reagenz in Gegenwart von Kupferionen.

Dazu werden drei Lösungen benötigt.

Lösung A: 2,0 g Na_2CO_3
0,02 g Kaliumnatriumtartrat
auf 100 ml mit 0,1 N NaOH auffüllen

Lösung B: 0,25 g $CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$
2,5 g SDS
auf 50 ml mit Wasser auffüllen

Lösung C: 50 Teile Lösung A und 1 Teil Lösung B

Die Lösung C wurde direkt vor Gebrauch gemischt, während A und B lagerungsfähig sind.

Zu der Proteinlösung (10 - 200 µl) wurde 1 ml Lösung C gegeben, alles sehr kräftig geschüttelt und 10 Minuten stehengelassen. 100 µl des Folin Ciocalteus Reagenz, das mit Wasser 1 : 2 verdünnt wurde, wurde dazugemischt. Nach einer halben Stunde Reaktion bei Raumtemperatur wurden diese Proben im Photometer (Modell 24 Beckman Instrument) bei 780 nm gegen den Blindwert gemessen, bei dem die Proteinlösung durch den entsprechenden Puffer ersetzt wurde.

Mit Hilfe einer Eichkurve, die mit eingewogenen Mengen Humanalbumin hergestellt wurde, konnte man unter Berücksichtigung der entsprechenden Volumina den Proteingehalt der eingesetzten Proteinlösung ermitteln.

5.2. Cholesterin und Cholesterinesterbestimmung

Diese beiden Lipide wurden mit Hilfe eines enzymatischen Farbtestes der Firma Boehringer, Mannheim, quantifiziert. Der Test wurde als Mikrotest mit 5 bzw. 10 µl Probenvolumen durchgeführt. Die Werte wurden an einer Cholesterineichkurve, die mit Testproben derselben Firma hergestellt wurde, ermittelt. Der Cholesterinestergehalt ergab sich aus der Differenz zwischen Gesamtcholesterin und unverestertem Cholesterin.

5.3. Gelchromatographie

Als Trägersubstanz diente Ultrogel Ac 34 von LKB. Dieses Gel ist eine Mischung von Agarose und Polyacrylamid und wird bereits vorgequollen geliefert. In einer Chromatographiesäule wurde damit eine Gelsäule gegossen (1,0 cm x 100 cm) und diese mit 0,05 M Tris-HCl pH 7,4; 0,1 M NaCl; 0,5 mM Natriumtaurocholat und 1,0 mM DTE equilibriert.

Dann wurde die Probe (saubere LCAT oder das Proteingemisch aus Humanalbumin, Ovalbumin und Cytochrom C sowie Dextranblau und ß-Mercaptoäthanol) aufgetragen. Die Chromatographie erfolgte mit demselben Puffer wie die Equilibrierung. Die Elutionsgeschwindigkeit betrug 5 ml/ Std. Das Eluat wurde in einem Zweistrahlphotometer (Uvicord III LKB) bei 280 nm gegen den Elutionspuffer gemessen und anschließend fraktioniert (Ultro Rac LKB).

Die einzelnen Fraktionen der Chromatographie mit sauberer LCAT wurden auf LCAT-Aktivität geprüft. Um das Molekulargewicht zu ermitteln, wurden zuerst die Volumina gemessen, nach denen die Proteine und die beiden anderen Marker eluiert wurden. Dabei zeigt das durchlaufende Dextranblau an, wann überhaupt ein Partikel durch die Säule gewandert sein kann und grenzt dabei das sog. Totvolumen (V_o) ab. Das ß-Mercaptoäthanol zeigt an, wann alles eluiert sein muß (Endvolumen V_e). Man subtrahiert von den Elutionsvolumina der Proteine das Totvolumen V_o und dividiert durch V_e.

Der Wert ist proportional dem Logarithmus des Molekulargewichts der Proteine. Anhand einer Eichkurve mit bekannten Proteinen kann man dann das Molekulargewicht des unbekannten Proteins ermitteln.

5.4. Herstellung des Hydroxylapatits

Für die LCAT-Präparation wurde das Hydroxylapatit nach dem Verfahren von Ö. LEVIN[46] hergestellt. Dazu wurden in einem 5-l-Becherglas 2 l 0,5 M $CaCl_2$- und 2 l 0,5 M Na_2HPO_4-Lösung langsam (10 - 12 ml pro Minute) unter Rühren zusammengetropft. Nach dem Absetzen des Niederschlags wurde der Überstand abgesaugt und der Rest mit Wasser auf 3 Liter aufgefüllt.

Dazu kamen 100 ml 40 %-ige NaOH (w/w) . Diese Mischung wurde unter starkem Rühren und starker Hitze (Bunsenbrenner) 45 Minuten gekocht, danach für eine Stunde bei langsamem Rühren und geringer Hitze.

Man ließ den Niederschlag 5 min absetzen und saugte dann den noch trüben Überstand ab. Der Niederschlag wurde viermal mit je 4 l Wasser gewaschen, wobei man bis zum Absaugen jeweils 5 min wartete. Danach wurde das Hydroxylapatit dreimal mit je 4 l 0,01 M Natriumphosphatpuffer pH 6,8 15 min unter Rühren gekocht und nach jeweils 5 min der Überstand abgesaugt. Diesen Vorgang wiederholte man zweimal unter denselben Umständen mit 0,001 M Natriumphosphatpuffer pH 6,8 . Danach ist das Hydroxylapatit fertig und kann für zwei Monate im Kühlschrank aufgehoben werden. Für ein gutes Produkt, das eine hohe Durchflußgeschwindigkeit bei der Chromatographie erlaubt, ist es wichtig, beim Waschen mit dem Phosphatpuffer nicht zu heftig zu rühren und zu kochen.

5.5. Dichtegradientenultrazentrifugation

Zur Auftrennung der Lipoproteine wurde die Methode von REDGRAVE[47] modifiziert. Das Serum wurde mit 0,325 g/ml festem KBr auf eine Dichte von 1,21 g/ ml eingestellt und im 40.3 Rotor in einer L-5-65 Ultrazentrifuge 24 Stunden bei 39000 Umdrehungen / min zentrifugiert. Die flotierten Lipoproteine wurden mit einer Spritze abgenommen und bei Bedarf auf 4 ml mit einer KBr-Lösung der Dichte d = 1,21 g/ ml aufgefüllt. Sie wurden unter einem Salzgradienten in einem Röhrchen eines SW-41 Swinging-bucket-Rotor (Beckman Instrument) geschichtet.

Der Gradient wurde folgendermaßen aufgebaut. Zwei ml NaCl-Lösung der Dichte d = 1,009 g/ ml wurden mit zwei ml einer NaCl-KBr-Lösung der Dichte d = 1,015 g/ ml unterschichtet. Darunter kamen 3 ml einer Salzlösung mit d = 1,063 g/ ml und schließlich die Lipoproteine von der vorhergehenden Ultrazentrifugation.

Nach der anschließenden Ultrazentrifugation bei 40000 Umdrehungen pro min bei einer Dauer von 24 Stunden und 4° C wurden die Röhrchen von unten punktiert und der Gradient fraktioniert. Die Fraktionen, ungefähr 0,35 ml , wurden für die Analyse verwendet. Die Dichte wurde mit Hilfe eines Refraktometers bestimmt.

5.6. Aminosäureanalyse

Die saubere LCAT wurde gegen Wasser dialysiert, mit der gleichen Volumenmenge konz. HCl (37 %) versetzt und in Schraubröhrchen 24 Stunden bei 110° C hydrolysiert. Danach wurden die Proben mehrfach am Rotarvapor mit Wasser abgedampft, um die Salzsäure zu entfernen und dann für die Aminosäureanalyse verwendet. Die Analyse der Aminosäuren wurde in einem Einsäulensystem der Firma Biocal durchgeführt. Das Gerät hat die Bezeichnung BC 201. Als Austauscherharz wurde BioRad A 6 verwendet.

Die Identifizierung und Quantifizierung der Aminosäuren erfolgte mit Hilfe eines Testgemisches, das 50 nmol pro Aminosäure enthielt und unter identischen Bedingungen chromatographiert wurde.

Die Perameisensäureoxydation erfolgte nach der Methode von HIRS[48]. Das Perameisensäurereagenz wurde aus 1 ml 30 %-iger H_2O_2 und 9 ml 88 %-iger Ameisensäure hergestellt und davon 2 ml zum gefriergetrockneten Protein gegeben. Die Reaktionsdauer betrug 4 Stunden bei 0° C. Das überschüssige Reagenz wurde mit 0,3 ml 48 %-ige HBr in der Kälte abgebaut und die Lösung bei 40° C abgedampft. Danach ist das Protein zur Hydrolyse fertig.

Cystein liegt dann als Cysteinsäure vor, und Methionin als Methioninsulfon, welches bei der Aminosäurechromatographie zwischen Asparaginsäure und Threonin eluiert wird.

5.7. Elektronenmikroskopie

Die Lipoproteine wurden nach dem " negative staining " - Verfahren fixiert und in einem Philips EM-300 Elektronenmikroskop bei 60 KV analysiert. Die Lipoproteinfraktionen wurden mit der gleichen Menge 1 %-iger Ammoniumacetatlösung pH 8,0 und 4 %-iger Phosphorwolframsäure pH 7,4 verdünnt. Diese Lösung kann ungefähr 1 Woche im Kühlschrank aufbewahrt werden. Für die Elektronenmikroskopie wurde davon ein Tropfen auf die Trägernetze aufgetragen, nochmals mit Phosphorwolframsäure fixiert und die Netze für die Elektronenmikroskopie verwendet.

6. Chemikalien

Fast alle Chemikalien waren p.A.-Substanzen von Merck, Darmstadt. Natriumtaurocholat und Dithioerythritol (beide A grade) von Sigma, München. SDS kam von Serva, Heidelberg, ebenso N,N'- Methylenbisacrylamid, Tetramethyläthylendiamin, Merthiolat (Äthylmercurithiosalicylsäure Natriumsalz) und Triton X-100. Das Acrylamid war vierfach umkristallisiert und kam von Roth. Das SDS wurde in unserem Labor 2 x aus Äthanol umkristallisiert. 5,5'- Dithiobis- (2-Nitrobenzoësäure) wurde von Calbiochem, San Diego, bezogen, Ampholine von LKB, Bromma, Schweden, ebenfalls Ultrogel Ac 34. Agarose C kam von Pharmacia, Uppsala, Schweden.

7. Abkürzungen

LCAT	Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase
HDL	Lipoproteine mit hoher Dichte
LDL	Lipoproteine mit geringer Dichte
VLDL	Lipoproteine mit sehr geringer Dichte
VHDL	Lipoproteine mit sehr hoher Dichte
Lp-E	Lipoprotein E
Lp-X	Lipoprotein X
SDS	Natriumdodecylsulfat
DTE	Dithioerythritol
DTNB	5,5'- Dithiobis-(2-Nitrobenzoësäure)
Tris	Tris- (hydroxymethyl)-aminomethan
ÄDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
1 mU	entspricht: 1 µmol Substratumsatz pro Minute bei 37°C.

Literaturverzeichnis

1. Sperry, W.M., J. Biol. Chem. 111,S. 467 (1935)
2. Glomset, J.A., Biochim. Biophys. Acta 58,S.398 (1962)
3. Gofman, J.W., Lindgren, F.T. und Elliott, H. J. Biol. Chem. 179, S. 937 (1949)
4. Alaupovic, P. in: Protides of the Biological Fluids, 19th Colloquium, Bruges (Belgium) 1971 (Peeters, H. ed.) S. 9
5. Glomset, J.A., Jansen, E.T.,Kennedy, R. und Dobbins, J., J. Lipid Res. 7, S. 638 (1966)
6. Fielding, C.J., Shore,V.G. und Fielding, P.E., Biochim. Biophys. Acta, 270, S. 513 (1972)
7. Fielding, C.J., Shore, V.G. und Fielding, P.E., Biochim. Biophys. Res. Commun. 46, S. 1493 (1972)
8. Fielding, C.J., Scand. J. clin. Invest. 33, Suppl. 137, S. 15 (1974)
9. Nordby, G. und Norum, K.R., Scand. J. clin. Invest., S. 678 (1975)
10. Assmann, G., Donath, N. und Lekim, D., Vortrag auf dem " Colloquium of the Protides of the Biological Fluids ", Brugge (Belgium) 1977
11. Soutar, A.K., Garner, C.W., Nordean Baker,H., Sparrow, J.T., Jackson, R.L., Gotto, A.M. und Smith, L.C., Biochemistry 14, S. 3057 (1975)
12. Kostner, G., Scand. J. clin. Invest. 33 Suppl. 137, S. 19 (1974)
13. Stokke, K.T., Atheriosklerosis 19, S. 393 (1973)
14. Goldstein, J.L., Dana, S.E. und Brown, M.S., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71, S. 4288 (1974)

15. Norum, K.R., Glomset, J.A. und Gjone, E. in: The Metabolic Basis of Inherited Disease (3rd ed.) (Stanbury, J.R., Wyngaarden, J.H. und Frederickson, D.S., eds.) S. 531 (1972) McGraw-Hill, New York

16. Osuga, T. und Portmann, O.W., Amer. J. Physiol. 220, S. 735 (1971)

17. Utermann, G., Schoenborn, W., Langer, K.H. und Dieker, P., Humangenetik 16, S. 295 (1972)

18. Utermann, G., Menzel, H.J., und Schoenborn, W., FEBS-Letters 45, S. 29 (1974)

19. Utermann, G., Menzel, H.J., Langer, K.H. und Dieker, P., Humangenetik 27, S. 185 (1975)

20. Hamilton, R.L., Williams, M.C., Fielding, C.J. und Havel, R.J., J. Clin. Invest. 58 S. 667 (1976)

21. Fielding, C.J. und Fielding, P.E., FEBS-Letters 15,S. 355 (1971)

22. Akanuma, Y. und Glomset, J.A., Biochim. Biophys. Res. Commun. 32, S. 639 (1968)

23. Lacko, A.G., Varma, K.G., Rutenberg, H.L. und Soloff, L.A., Scand. J. Clin. Invest. 33, Suppl. 137, S. 29 (1974)

24. Stokke, K.T. und Norum, K.R., Scand. J. clin. Invest 27, S. 21 (1971)

25. Glomset, J.A. und Wright, J.L., Biochim. Biophys. Acta 89, S. 266 (1964)

26. Blomhoff, J.P., Scand. J. clin. Invest. 33, Suppl. 137, S. 35 (1974)

27. Norum, K.R., Scand. J. clin. Invest. 33, Suppl. 137, S. 7 (1974)

28. Ornstein, L., Ann. N. Y. Acad. Sci. 121, S. 321 (1964)

29. Davis, B.J., Ann. N. Y. Acad. Sci. 121, S. 404 (1964)

30. Ouchterlony, Ö., Prog. Allerg. 5, S. 1 (1958)

31. Weber, K. und Osborn, M., J. Biol. Chem. 244, S. 4406 (1969)

32. McConathy, W.J. und Alaupovic, P., Biochemistry 15 S. 515 (1976)

33. Brewer, H.B., Lux, S.E., Ronan, R. und John, K.H., Proc. Nat. Acad. Sci., 69, S. 1306 (1972)

34. Tristram, G.R. und Smith, R.H., The Proteins (ed.) 1, S. 46 (1963), Acad. Press., N. Y.

35 Seidel, D., Agostini, B. und Müller, P., Biochim. Biophys. Acta 260, S. 146 (1972)

36. Neville, D.M. und Glossmann, H. in: Methods in Enzymology (Fleischer, S. und Packer, L., eds.), 32, S. 92 (1974) Academic Press, N.Y.

37. Albers, J.J. Cabana, V.G. und Dee Barden Stahl, Y., Biochemistry 15, S. 1084 (1976)

38. Varma, K.G. und Soloff, L.A., Biochem. J. 155, S. 583 (1976)

39. Varma, K.G., Nowotny, A.H. und Soloff, L.A., Biochim. Biophys. Acta 486, S. 378 (1977)

40 Kattermann, R, und Wolfrum, D.I., Z. klin. Chem. u. klin. Biochem. 8, S. 413 (1970)

41. Gjone, E., Skarbövik, A.J., Blomhoff, J.P. und Teisberg, P., Scand. J. clin. Invest. 33, Suppl. 137, S. 101 (1974)

42. Norum, K.R., Glomset, J.A., Nichols, A.V., Forte, T., Albers, J.J., King, W.C., Mitchell, C.D., Appelgate, K.R., Gong, E.L.,Cabana, V. und Gjone, E., Scand. J. clin. Invest. 35, Suppl. 142, S. 31 (1975)

43. Patsch, J.R., Soutar, A.K., Morrisett, J.D., Gotto, A.M. und Smith, L.C., Europ. J. Clin. Invest. 7,S.213(1977)

44. Laurell, C.-B., Anal. Biochem. 15, S. 45 (1966)

45. Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. und Randall, R.J., J. Biol. Chem. 193, S. 265 (1951)

46. Levin, Ö., in: Methods in Enzymology (Polowick, S.P. und Kaplan, N.O. eds.) 5, S. 27 (1962) Academic Press, N. Y.

47. Redgrave, T.G., Robert, D.C.K. und West, C.E., Analyt. Biochem. 65, S. 42 (1975)

48. Hirs, C.W.H. in: Methods in Enzymology (Hirs,C.W.H. ed.) 9, S. 59 (1967)

Herrn Dr. G. Utermann und Herrn Prof. G. Wendt danke ich für die Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit, desgleichen Herrn Prof. P. Karlson für seine wertvolle Diskussion.

Herrn W. Weber und Frau H. Becker möchte ich für ihre technische Mithilfe danken.

Bei Herrn Dr. G. Münscher von den Behringwerken,Marburg, möchte ich mich für die Immunisierung der Kaninchen zur Herstellung der Antisera bedanken.

Die Aminosäurechromatographie wurde dankenswerterweise von Prof. Ebert vom Institut für Poymere, Marburg, durchgeführt.

Ebenso möchte ich mich bei Herrn Dr. G. Adler vom Institut für Cytologie und Cytophatologie, Marburg, für die Elektronenmikroskopie bedanken.

Diese Arbeit entstand im Labor Dr. Utermann im Institut für Humangenetik, Marburg, und wurde von der DFG im Rahmen des Forschungsprogramms " Biochemische Humangenetik " unterstützt.

Lebenslauf

Am 14.02.1946 wurde ich als zweites Kind des Angestellten Paul Menzel und seiner Ehefrau Elisabeth geb. Diekmann in Erpen, Kreis Osnabrück geboren. Von Ostern 1952 bis Ostern 1956 besuchte ich die Volksschule in Bad Rothenfelde, danach bis 1960 die Mittelschule in Dissen und anschließend das Ernst-Moritz-Arndt-Gymnasium in Osnabrück, wo ich im März 1966 die Reifeprüfung ablegte.

Vom Sommersemester 1966 ab studierte ich Chemie, Leibeserziehung und Pädagogik an der Philipps-Universität Marburg. Im Wintersemester 1968/69 war ich an der Leopold-Franzens-Universität Innsbruck inskribiert. Nach dem Fortsetzen des Studiums in Marburg bestand ich im Dezember 1971 das 1. Staatsexamen für das Lehramt an Gymnasien.

Von da ab arbeitete ich im Institut für Humangenetik in Marburg als wissenschaftlicher Mitarbeiter im Rahmen des DFG-Forschungsprogramms "Biochemische Grundlagen der Humangenetik".